



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **ESTUDO IN VITRO DO GRAU DE CITOTOXICIDADE DE RESINA ACRÍLICAS USADAS NA CONFEÇÃO DE COROAS PROVISÓRIAS**

Trabalho submetido por  
**Ana Rita da Graça Luís**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Setembro de 2014**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **ESTUDO IN VITRO DO GRAU DE CITOTOXICIDADE DE RESINAS ACRÍLICAS USADAS NA CONFEÇÃO DE COROAS PROVISÓRIAS**

Trabalho submetido por  
**Ana Rita da Graça Luís**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutor Sérgio Félix**

e coorientado por  
**Prof. Doutora Evguenia Bekman**

**setembro de 2014**



## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos aqueles que estiveram presentes e me apoiaram na concretização deste projeto:

Ao meu orientador Prof. Doutor Sérgio Félix por ter acreditado em mim para a execução deste trabalho e toda a disponibilidade e orientação prestada;

À minha co-orientadora Prof. Doutora Evguenia Bekman pela ajuda e saber da cultura de células em laboratório;

À Prof. Doutora Isabel Barahona por todo o apoio que sempre me prestou ao longo do trabalho;

À professora Susana Bandarra pela ajuda e dedicação que teve desde o início;

Ao Prof. Doutor António Pedro Alves de Matos e à Dra. Maria José Morsoleto pela colaboração na execução da coloração de *Giemsa* e obtenção das fotografias do microscópio;

Aos meus pais, por sempre me terem apoiado e incentivado a ir mais longe durante todo o meu período académico;

Aos meus avós e restante família, pelo enorme orgulho que sempre demonstraram em mim;

Ao meu irmão, por estar sempre ao meu lado e se preocupar comigo mais que ninguém;

Ao Mickäel Santos, por todas as horas que esperou enquanto eu ia controlar o crescimento celular e me apoiou incondicionalmente dando-me força para nunca desistir mesmo nos momentos mais difíceis;

A todos os meus amigos que sempre estiveram presentes quando precisei deles e me apoiaram durante esta fase;

À minha amiga e colega de box Ana Carrilho que durante estes cinco anos partilhou comigo muitas vivências e sempre me ajudou em todos os momentos;

*A todos um muito sincero Obrigada.*



## RESUMO

**Objetivo:** As coroas provisórias contactam diretamente com tecidos periodontais e dentes durante algumas semanas ou meses. As resinas utilizadas nessas restaurações provisórias podem causar efeitos adversos nos tecidos, muito provavelmente devido aos seus constituintes químicos. Assim, é fundamental testar a citotoxicidade destes materiais para garantir a segurança clínica. O objetivo do presente estudo é comparar o efeito citotóxico de três diferentes materiais de restauração provisória em fibroblastos, nomeadamente o Protemp 4<sup>TM</sup> (bis-acrílico); Structur 3<sup>®</sup> (dimetacrilato de uretano) e Tab 2000<sup>®</sup> (metil metacrilato).

**Métodos:** As resinas foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante, e em seguida foram imersas em meio de cultura e incubadas durante 24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias. Os fibroblastos 3T3 foram expostos a diferentes diluições dos extratos de 24 h. A viabilidade celular foi avaliada utilizando dois ensaios diferentes (MTT e cristal violeta).

**Resultados:** O extrato da resina de dimetacrilato de uretano é mais tóxico que a resina de bis-acrílico e metil metacrilato. Este efeito é diretamente proporcional quanto mais extrato é adicionado. A concentração mais elevada da resina de dimetacrilato de uretano causa citotoxicidade significativa nas células (apenas 20% da viabilidade das células,  $p < 0,001$ ). O aumento do tempo de incubação diminui a citotoxicidade das três resinas testadas.

**Conclusão:** Os materiais restauradores provisórios têm efeitos citotóxicos ao nível dos fibroblastos, principalmente a resina de dimetacrilato de uretano. A estabilidade química do material pode ser alterada ao longo do tempo. O poder citotóxico das resinas é menor com o aumento do tempo de incubação das resinas.

**Palavras-chave:** *Citotoxicidade; provisórios; resinas; fibroblastos*





## ABSTRACT

**Objective:** The provisional crowns contact directly with periodontal tissues and teeth for, at least, a few months. The resins used in these provisional restorations may cause adverse effects in these tissues most likely through the toxicity of some of their chemical constituents. Thus it is fundamental to test the cytotoxicity of these compounds to ensure clinical safety. The aim of the present study is to evaluate the cytotoxic effects of three different provisional restoration materials on gingival fibroblasts, namely Protemp 4<sup>®</sup> (bis-acrylic based), Structur 3<sup>®</sup> (urethan dimethacrylate based) and Tab 2000<sup>®</sup> (methyl methacrylate based).

**Methods:** Materials were prepared according to the manufacturers' instructions and then were immersed in medium and left to elute for 24h, 48h, 72h and 5 days. 3T3 fibroblasts were exposed to different dilutions of the extracts for 24h. Cell viability was measured using two different assays (MTT and Crystal Violet).

**Results:** The extract of urethan dimethacrylate based resin is more toxic than the bis-acrylic and methyl methacrylate based resins. This effect is directly proportional to how much extract is added. The highest concentration of urethane dimethacrylate resin cause significant cytotoxicity in cells (only 20% of cell viability,  $p < 0,001$ ). Increasing the incubation time decreases the cytotoxicity of the three tested resins.

**Conclusion:** Our study shows that the provisional restorative materials have cytotoxic effects on fibroblasts, in particular, the urethan dimethacrylate based resin. The chemical stability may be changed over time. The cytotoxic resins power is smaller with increasing incubation time of the resins.

**Keywords:** *Cytotoxicity; provisional; resins; fibroblasts cells*



## ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO .....	17
1. COROAS PROVISÓRIAS .....	19
1.1 MÉTODOS DE CONFEÇÃO .....	19
1.2 MATERIAIS PARA CONFEÇÃO DE COROAS PROVISÓRIAS.....	21
1.2.1 METACRILATOS .....	21
1.2.2 RESINAS COMPOSTAS .....	23
1.2.3 PROPRIEDADES .....	24
1.3 RELAÇÃO DAS COROAS PROVISÓRIAS COM O PERIODONTO.....	27
2. TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	30
2.1 TESTE DE REDUÇÃO DO MTT.....	32
2.2 TESTE DE CRISTAL VIOLETA .....	33
3. OBJECTIVO .....	35
4. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS .....	35
II. MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
1. MATERIAIS .....	36
1.1. Resinas .....	36
1.2. Linha Celular .....	38
1.3. Reagentes .....	39
1.4. Equipamentos do laboratório de cultura de células .....	40
2. MÉTODOS.....	41
2.1. Preparação das resinas .....	41
2.2. Cultura de células – Fibroblastos 3T3 .....	42
2.2.1. Subculturas .....	43
2.3. Determinação da viabilidade celular.....	44
2.3.1. Ensaio do MTT.....	45
2.3.2. Ensaio do Cristal Violeta.....	45
A. Ensaio I: OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS.....	47
B. ENSAIO II: Extrato das resinas de 24 horas de libertação em contacto com $4 \times 10^3$ células .....	47

B - I. Coloração de Giemsa das células 3T3 em contacto com o extrato da resina R3 após 24 horas de libertação.....	49
ENSAIO III: Extrato das resinas de 48 horas, 72 horas e 5 dias .....	50
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53
III. RESULTADOS .....	54
A. Ensaio I: OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS.....	55
B. ENSAIO II: Extrato das resinas após 24 horas de libertação.....	56
B.1. Resina R1 .....	59
B.2. Resina R2 .....	60
B.3. Resina R3 .....	61
B.4. Comparação da percentagem de viabilidade celular das diferentes resinas quando adicionado a mesma quantidade de extrato .....	63
B - I. Coloração de Giemsa das células 3T3 em contacto com o extrato da resina R3 após 24 horas de libertação.....	65
C. ENSAIO III: Extrato das resinas durante 48 horas, 72 horas e 5 dias de libertação.....	67
C.1. Resina R1 .....	70
C.2. Resina R2 .....	71
C.3. Resina R3 .....	72
C.4. Comparação da percentagem de viabilidade celular das diferentes resinas pré-incubadas pelo mesmo período de tempo .....	74
IV. DISCUSSÃO.....	77
V. CONCLUSÃO .....	83
VI. BIBLIOGRAFIA.....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Recessão gengival associada a coroas provisórias (Goldberg, Higginbottom, & Wilson, 2008). .....	28
<b>Figura 2.</b> Tipo de contacto entre as células e o material a ser testado; a) contacto direto; b) Contacto indireto; c) Extrato do material (Knetsch, 2013). .....	31
<b>Figura 3.</b> Redução do MTT a formazan pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (Knetsch, 2013). .....	33
<b>Figura 4.</b> a) Protemp 4 <sup>TM</sup> - 3 M ESPE; b) Structur 3 <sup>®</sup> - VOCO; c) Tab 2000 <sup>®</sup> - KERR	36
<b>Figura 5.</b> Células 3T3 observadas ao M.O (ATCC, 2014). .....	38
<b>Figura 6.</b> Fotografia dos 4 discos das resinas em 7 ml de DMEM. ....	41
<b>Figura 7.</b> Câmara de Neubauer (BMM 5777 – Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia). .....	44
<b>Figura 8.</b> Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no ensaio II (imagens de Inforlab (2014) e Basprix (2014)). .....	49
<b>Figura 10.</b> Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no ensaio III – período de incubação das resinas de 72 horas (imagens de Inforlab (2014) e Basprix (2014) .....	51
<b>Figura 9.</b> Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no ensaio III – período de incubação das resinas de 48 horas (imagens de Inforlab (2014) e Basprix (2014) .....	51
<b>Figura 11.</b> Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no ensaio III – período de incubação das resinas de 5 dias (imagens de Inforlab (2014) e Basprix (2014) .....	52
<b>Figura 12.</b> Sequência de ensaios realizados .....	54
<b>Figura 13.</b> Imagens ao MO (objetiva 10x e 20x) do resultado da cultura de células após 24 horas de contacto com o meio de cultura coradas pela coloração de Giemsa. ....	66
<b>Figura 14.</b> Imagens ao MO (objetiva 40x) do resultado da cultura de células após 24 horas de contacto com o meio de cultura coradas pela coloração de Giemsa. ....	66
<b>Figura 15.</b> Imagens ao MO (objetiva 20x e 40x) do resultado da cultura de células após 24 horas de contacto com o extrato da resina R3 coradas pela coloração de Giemsa....	66

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resinas utilizadas no presente trabalho (3M, 2014; VOCO, 2012; Kerr, 2011).....	37
<b>Tabela 2.</b> Reagentes utilizados no presente trabalho .....	39
<b>Tabela 3.</b> Equipamentos do laboratório de cultura de células. ....	40
<b>Tabela 4.</b> Diluições realizadas no ensaio II .....	48
<b>Tabela 5.</b> Valores médios de absorvância (595 nm) referentes ao número de células do inóculo $\pm$ desvios padrão após ensaio de redução do MTT.....	55
<b>Tabela 6.</b> Valores médios de percentagem de viabilidade celular após o contacto por 24 horas das diferentes quantidades da resina R1,R2 e R3 referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão.....	57
<b>Tabela 7.</b> Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R1 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. O <i>p-value</i> corresponde ao nível de significância entre as várias quantidades de extrato. (a), (b) e (c) corresponde aos sub-grupos homogêneos.....	59
<b>Tabela 8.</b> Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R2 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. O <i>p-value</i> corresponde ao nível de significância entre as várias quantidades de extrato. (a), (b) e (c) corresponde aos sub-grupos homogêneos.....	60
<b>Tabela 9.</b> Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R3 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. O <i>p-value</i> corresponde ao nível de significância entre as várias quantidades de extrato. (a), (b), (c) e (e) corresponde aos sub-grupos homogêneos. ....	61
<b>Tabela 10.</b> Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com a mesma quantidade de extrato da resina R1, R2 e R3 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. O <i>p-value</i> corresponde ao nível de significância entre as várias resinas. (a), (b) e (c) corresponde aos sub-grupos homogêneos.....	63

<b>Tabela 11.</b> Valores médios de percentagem de viabilidade celular das células 3T3 após contacto com os extratos libertados durante 24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias da resina R1, R2 e R3 referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. ....	68
<b>Tabela 12.</b> Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com os extratos da resina R1 com diferentes períodos de pré-incubação (24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias) referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. O <i>p-value</i> corresponde ao nível de significância entre os vários períodos de pré-incubação. ....	70
<b>Tabela 13.</b> Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com os extratos da resina R2 com diferentes períodos de pré-incubação (24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias) referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. O <i>p-value</i> corresponde ao nível de significância entre os vários períodos de pré-incubação. (a) e (b) correspondem aos grupos homogéneos. ....	71
<b>Tabela 14.</b> Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com os extratos da resina R3 com diferentes períodos de pré-incubação (24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias) referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. O <i>p-value</i> corresponde ao nível de significância entre os vários períodos de pré-incubação. (a) e (b) correspondem aos grupos homogéneos. ....	72
<b>Tabela 15.</b> Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com os extratos das diferentes resinas com o mesmo tempo de pré-incubação referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. O <i>p-value</i> corresponde ao nível de significância entre as várias resinas. (a), (b) e (c) corresponde aos sub-grupos homogéneos. ....	74

## ÍNDICE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Valores médios de absorvância (595 nm) obtidos através do ensaio do MTT referentes ao número de células do inóculo.....	56
<b>Gráfico 2.</b> Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 após 24 horas de contacto com diferentes quantidades de resina R1, R2 e R3 determinado pelo ensaio de redução do MTT $\pm$ desvio padrão.....	57
<b>Gráfico 3.</b> Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 após 24 horas de contacto com diferentes quantidades de resina R1, R2 e R3 determinado pelo ensaio de coloração violeta cristal $\pm$ desvio padrão. ....	58
<b>Gráfico 4.</b> Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R1 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. ....	59
<b>Gráfico 5.</b> Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R2 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. ....	60
<b>Gráfico 6.</b> Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R3 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. ....	62
<b>Gráfico 7.</b> Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com a mesma quantidade de extratos da resina R1, R2 e R3 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão. ....	64
<b>Gráfico 8.</b> Percentagens de viabilidade celular das células 3T3 após contacto com os extratos libertados durante a pré-incubação das resinas R1, R2 e R3 por 24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias referentes ao ensaio do MTT $\pm$ desvio padrão.....	68
<b>Gráfico 9.</b> Percentagens de viabilidade celular das células 3T3 após contacto com os extratos libertados durante a pré-incubação das resinas R1, R2 e R3 por 24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias referentes ao ensaio do violeta cristal $\pm$ desvio padrão.....	69
<b>Gráfico 10.</b> Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com extratos de resina R1 com diferentes períodos de pré-incubação referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão... ..	70



<b>Gráfico 11.</b> Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com extratos de resina R2 com diferentes períodos de pré-incubação referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão...	72
<b>Gráfico 12.</b> Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com extratos de resina R3 com diferentes períodos de pré-incubação referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão...	73
<b>Gráfico 13.</b> Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com os extratos da resina R1, R2 e R3 pré-incubados pelo mesmo período de tempo referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal $\pm$ desvio padrão.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

3T3 - Células NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™)

Bis-EMA - Etoxilato Bisfenol A dimetacrilato

Bis-GMA - Bisfenol A-Metacrilato de Glicidila

CV - Cristal Violeta

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Sigma, Reino Unido)

DMSO - Dimetilsulfóxido (Merck, EUA)

FBS - *Fetal Bovine Serum* (Sigma, EUA)

ISO - *International Organization Standardization*

MO - Microscópio Ótico Axiovert 25 (Zeiss, EUA)

MTT - Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (Sigma, Reino Unido)

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Gibco, Reino Unido)

PEMA - Polietil Metacrilato

PMMA - Polimetil Metacrilato

R1 - Protemp 4™ (3M, ESPE)

R2 - Tab 2000® (KERR)

R3 - Structur 3® (VOCO)

UDMA - Dimetacrilato de Uretano

## **I. INTRODUÇÃO**

A reabilitação de um doente com perda de peças dentárias ou destruição da integridade de um ou mais órgãos dentários é imperativa para manter a harmonia dentária e facial, bem como as funções mastigatória, fonética e articular. O tratamento reabilitador fixo pode ir desde a restauração de uma única peça dentária até à reabilitação de uma arcada inteira, para tal é essencial um diagnóstico e planeamento correto de todas as fases, incluindo uma correta escolha de todos os materiais utilizados na mesma (Shillingburg, et al., 2012a).

Durante a reabilitação oral fixa há uma fase provisória, que corresponde ao período de tempo que decorre entre a preparação inicial da restauração e a cimentação da restauração definitiva, período em que a peça definitiva está a ser executada (Burns, Beck, & Nelson, 2003; Balkenhol, Ferger, Mautner, & Wöstmann, 2007). Esta fase pode durar poucas semanas a alguns meses, devendo a restauração provisória satisfazer os objetivos pretendidos, e não causar qualquer tipo de reação adversa nos tecidos periodontais que a rodeiam, bem como no dente ou dentes a reabilitar (Cleveland, Allen, & Henson, 2012; García- López, Rezende, Hiramatsu, Nishida, & Rubo, 2013).

As restaurações provisórias utilizadas no período de cicatrização dos tecidos após cirurgia de implantes não devem causar irritação nos tecidos periodontais a fim de garantir uma boa saúde periodontal, bom perfil gengival de emergência e subsequente estética (Palacci & Nowzari, 2008).

Os termos provisório, temporário ou transitório são comumente encontrados na literatura, mas o termo temporário é controverso e considerado inadequado por alguns autores visto que as restaurações provisórias desempenham funções de grande importância, e a designação de tratamento temporário pode ser interpretada como sendo de menor importância ou valor (Burns, Beck, & Nelson, 2003).

As restaurações provisórias são importantes para que os dentes ou pilares preparados estejam protegidos, e para que o doente permaneça confortável durante as fases de execução da restauração definitiva. Através de uma restauração provisória bem-

sucedida, o médico dentista pode ganhar a confiança do doente e influenciar favoravelmente no sucesso do tratamento final (Shillingburg, et al., 2012b).

Os objetivos principais de uma restauração provisória são a oclusão, proteção dos dentes ou pilares, a manutenção e avaliação dos tecidos periodontais, promover a estética, informar sobre o diagnóstico, evitar a movimentação dos dentes pilares, auxiliar na estabilização de dentes com mobilidade e proporcionar conforto ao doente durante as funções de fala e mastigação (Michalakis, Pissiotis, Hirayama, Kang, & Kafantaris, 2006; García- López, Rezende, Hiramatsu, Nishida, & Rubo, 2013).

As restaurações provisórias podem funcionar como um meio de comunicação entre o doente, o médico dentista e o técnico de prótese dentária, tendo por isso um papel fundamental no sucesso das restaurações definitivas tanto a nível funcional como estético, além de permitirem uma preparação psicológica do doente e percepção das limitações do tratamento (Burns, Beck, & Nelson, 2003; Konstantinidis, Kotsakis, Pallis, & Walter, 2013).

Os principais materiais utilizados na confecção de coroas provisórias são as resinas acrílicas, que como qualquer material utilizado em medicina dentária devem obedecer a diversos requisitos para poderem ser utilizados no interior da cavidade oral, para além de cumprir as funções desejadas. Estes materiais devem ter características mecânicas e físicas, como baixa contração após polimerização para proporcionarem uma boa adaptação marginal, resistência à fratura, baixa condutividade térmica. Biologicamente não devem induzir irritação da polpa dentária e tecidos gengivais e poderem ser higienizadas (Ayuso-Montero, Martinez-Gomis, Lujan-Climent, Salsench, & Peraire, 2009).

As restaurações provisórias estão em íntimo contacto com os tecidos periodontais, como tal não devem prejudicar a saúde do periodonto, e para além disso, devem promover a cicatrização do mesmo proporcionando uma matriz que permita a remodelação dos tecidos gengivais, principalmente em regiões com elevadas necessidades estéticas (Burns, Beck, & Nelson, 2003). As reações nocivas nos tecidos periodontais provocadas por estas restaurações devem ser evitadas para se conseguir um melhor perfil de tecido gengival ao redor da prótese definitiva e melhor estética (Borzangy, Labban, & Windsor, 2013).

Para manter a integridade dos tecidos periodontais, os materiais utilizados devem ser biocompatíveis para minimizar os efeitos adversos induzidos pelo contacto direto sobre os tecidos. Assim vários testes *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos com o objetivo de quantificar e qualificar a biocompatibilidade dos biomateriais com aplicação clínica (Pourabbas, et al., 2009).

A biocompatibilidade é então, definida como a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado nos tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem contudo provocar prejuízo no mesmo, incluindo a interação entre o hospedeiro, o material e a função deste, devendo estes três fatores estar em harmonia depois do material ser considerado biocompatível (Jorge, Giampaolo, & Pavarina, 2004).

Os estudos *in vitro*, que incluem os testes de citotoxicidade são a primeira etapa dos testes de biocompatibilidade, e consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contacto com células observando-se a existência ou não de alterações celulares, inibição de crescimento ou até mesmo morte celular (Rogerio, Lugão, Ikeda, & Cruz, 2003).

## **1. COROAS PROVISÓRIAS**

### **1.1 MÉTODOS DE CONFEÇÃO**

No tratamento reabilitador fixo estão descritas várias técnicas e materiais para a confecção das coroas provisórias que devem ser escolhidas de acordo com o caso clínico em si, experiência clínica do médico dentista, duração que a restauração permanecer em boca bem como o custo do material. Cada vez mais as coroas provisórias devem ser de alta qualidade, pois a diferença entre estas e a restauração definitiva deve ser apenas o material com que são feitas (Watanabe, et al., 2013; Papadopoulos, Pozidi, Goussias, & Kourtis, 2014). Devem ter características mecânicas, biológicas, de forma e estrutura satisfatórias para garantir o sucesso final das restaurações definitivas (Haselton, Diaz-Arnold, & Vargas, 2002).

Numerosas técnicas de execução de coroas provisórias unitárias ou múltiplas estão descritas na literatura, que podem ser genericamente fabricadas usando a técnica direta, fabricada intra-oralmente, indireta no laboratório ou a combinação destas duas técnicas quando a restauração é feita extra-oralmente e terminada intra-oralmente (Ayuso-Montero, Martinez-Gomis, Lujan-Climent, Salsench, & Peraire, 2009; Konstantinidis, Kotsakis, Pallis, & Walter, 2013).

Apesar das restaurações feitas pela técnica indireta apresentarem uma melhor adaptação marginal, visto ser feita num modelo de gesso e permitir uma melhor visualização das margens, contornos e contactos interproximais, a técnica direta tem sido amplamente usada pelos médicos dentistas. Para execução desta técnica são necessárias matrizes que podem ser de hidrocolóide irreversível, material de impressão elastomérico (*putty*) ou placas termoplásticas moldadas a vácuo (Cleveland, Allen, & Henson, 2012).

A confecção de coroas provisórias por esta técnica apresenta como desvantagem a possibilidade de libertação de monómeros livres pelo material resinoso utilizado, uma vez que polimeriza intra-oralmente, estando descritos como prejudiciais para a polpa principalmente quando há contacto direto com os túbulos de dentina abertos. Por outro lado, alguns dos materiais têm reações de polimerização exotérmicas provocando reações inflamatórias uma vez que estão em íntimo contato com o dente e tecidos periodontais (Michalakakis, Pissiotis, Hirayama, Kang, & Kafantaris, 2006). Estas restaurações são cimentadas logo após a sua execução, ficando expostas a forças oclusais pouco tempo depois da polimerização inicial, e alguns estudos têm demonstrado que a resistência inicial destas restaurações é relativamente baixa (Balkenhol, Köhler, Orbach, & Wöstmann, 2009; Kerby, Knobloch, Sharples, & Peregrina, 2013).

Por outro lado, a técnica indireta apesar de ter passos adicionais provoca uma menor irritação local e sensibilidade dos tecidos sendo mais confortável para os doentes. Esta técnica é indicada em casos complexos em que o doente não tolera muito tempo de consulta e em casos de reabilitação com próteses parciais fixas (Cleveland, Allen, & Henson, 2012; Shillingburg, et al., 2012b; Konstantinidis, Kotsakis, Pallis, & Walter, 2013).

## 1.2 MATERIAIS PARA CONFEÇÃO DE COROAS PROVISÓRIAS

Existe uma grande variedade de materiais polimerizáveis com indicação para o fabrico de coroas provisórias, que segundo a sua constituição química podem ser divididos genericamente em duas categorias: as resinas acrílicas de metacrilato (polimetil, polietil e polivinil-etil – metacrilatos) e as resinas compostas de Bis-acrílico, Bis-GMA (Bisfenol A-Metacrilato de Glicidila) e dimetacrilato de uretano. As restaurações provisórias podem ser também executadas através do recurso a coroas pré-fabricadas de policarbonato ou metal. (Kim & Watts, 2007; Shillingburg, et al., 2012b). Segundo a reação de polimerização podem ser quimicamente ativados (auto polimerizáveis), termo ativados ou de dupla polimerização (foto e quimicamente polimerizáveis), sendo que as resinas de metacrilato são na sua grande maioria auto polimerizáveis e as resinas compostas auto ou duo polimerizáveis (Balkenhol, Ferger, Mautner, & Wöstmann, 2007).

As resinas à base de polimetil metacrilato autopolimerizáveis foram durante muitos anos o material *standard* para a execução das coroas provisórias diretas e indiretas, contudo recentemente foram ganhando popularidade os materiais à base de resinas compostas para a técnica direta essencialmente devido à facilidade de manipulação (Balkenhol, Ferger, Mautner, & Wöstmann, 2007).

### 1.2.1 METACRILATOS

#### a) POLIMETIL METACRILATOS (PMMA)

A resina acrílica autopolimerizável de polimetil metacrilato foi a primeira a ser utilizada por volta de 1940 e desde aí foi a mais frequentemente utilizada para restaurações provisórias durante muitos anos (Burns, Beck, & Nelson, 2003).

O material é apresentado numa formulação de pó e líquido, o líquido é constituído predominantemente por metil metacrilato e pequenas quantidades de outros

constituintes químicos e o pó é constituído pelo polímero de metacrilato e dibutil ou dietilfolato. Existem em várias cores permitindo uma melhor adaptação estética para cada caso (Kurtzman, 2008). Segundo, Young, Smith, & Morton, 2001 as propriedades biológicas, físicas e mecânicas do material após a polimerização dependem muito do rácio pó/líquido utilizado durante a manipulação destas e as condições existentes durante a polimerização, tal como a temperatura.

As resinas de PMMA têm sido utilizadas por métodos diretos, indiretos e para rebasamentos de restaurações. Estudos anteriores têm demonstrado a contração de polimerização e a discrepância marginal como desvantagens destes materiais quando utilizados pela técnica direta, bem como o perigo de lesar a polpa dentária e o periodonto devido à reação de polimerização exotérmica e presença de monómeros livres (Young, Smith, & Morton, 2001).

Estas resinas apresentam como vantagens boa resistência mecânica facto, que é importante, visto serem submetidas a grandes forças mastigatórias, um bom polimento e estabilidade de cor durante algumas semanas, a facilidade de reparação, caso seja necessário e o custo, dado que são pouco dispendiosas (Chen, Lai, Chou, & Hu, 2008).

O polímero de metacrilato não é solúvel em água, mas os monómeros residuais e os eventuais aditivos constituintes podem ser solúveis em água. Os monómeros residuais são gradualmente libertados pelo material após a sua polimerização e consequentemente causam porosidades que permitem a infiltração de líquidos, corantes e fluídos presentes na cavidade oral (García- López, Rezende, Hiramatsu, Nishida, & Rubo, 2013).

#### **b) POLIETIL METACRILATOS (PEMA)**

A resina acrílica à base de etil metacrilato apresenta-se também como pó e líquido autopolimerizável que foi formulada para ser uma alternativa ao metil metacrilato e colmatar algumas das desvantagens deste. O líquido é constituído na sua maioria por etil metacrilato e outros químicos, e o pó pelo polímero e peróxido de benzoila, estando disponível também em várias cores (Kurtzman, 2008).

Este tipo de material é vantajoso para restaurações diretas uma vez que apresenta uma reação de polimerização exotérmica menor do que a da resina de PMMA não



provocando tantos danos na polpa e tecidos periodontais, bem como uma contração de polimerização menor. Apresenta boa resistência à coloração assim como um bom polimento sendo indicada para zonas estéticas, embora atualmente para estas zonas utiliza-se preferencialmente as novas resinas compostas. As PEMA também têm um cheiro mais agradável do que as PMMA (Mathur, et al., 2013).

### **c) POLIVINILETIL METACRILATOS**

Este material tem um comportamento clínico semelhante ao anterior, estando disponível também em pó e líquido, sendo autopolimerizável.

A estabilidade da cor é menor que os PMMA, contudo apresenta uma menor reação exotérmica. Os poliviniletil-metacrilatos têm menor resistência à flexão em relação ao PMMA, não sendo por isso usados em zonas de grandes forças mastigatórias. Estas características fazem com que os poliviniletil-metacrilatos sejam menos utilizados clinicamente em relação aos outros materiais provisórios descritos (Mathur, et al., 2013).

## **1.2.2 RESINAS COMPOSTAS**

Os materiais provisórios à base de resina composta foram desenvolvidos mais recentemente e têm ganho muita popularidade junto dos médicos dentistas, principalmente pela facilidade de manipulação, disponíveis como um sistema de auto-mistura contrariamente ao sistema tradicional pó/líquido dos metacrilatos e à sua elevada estética (Balkenhol, Ferger, Mautner, & Wöstmann, 2007; Poonacha, Poonacha, Salagundi, P.L, & Raghavan, 2013).

As resinas bis-acrílico são um material hidrofóbico que apresenta na sua constituição acrilatos bifuncionais, como o dimetacrilato preenchidos e reforçados por material inorgânico nomeadamente vidros ou partículas de sílica (Kim & Watts, 2004).

Estas resinas podem ser constituídas por diferentes dimetacrilatos, como o Bis-GMA ou outros análogos hidroxilados como o Bis-EMA (etoxilato bisfenol A dimetacrilato). Estes dimetacrilatos originam uma rede de polímeros, ou seja, uma estrutura tri-dimensional em que há uma taxa de polimerização e propriedades mecânicas superiores em relação aos metacrilatos de cadeias poliméricas lineares (Kim & Watts, 2004; Kerby, Knobloch, Sharples, & Peregrina, 2013).

Recentemente, várias resinas não Bis-GMA constituídas por dimetacrilato de uretano (UDMA) foram introduzidas para melhorar as propriedades mecânicas das restaurações, nomeadamente no que respeita à dureza e flexibilidade. Estudos anteriores demonstram que as resinas compostas à base de UDMA são mais resistentes devido à flexibilidade das ligações do uretano dentro da matriz polimérica (Kerby, Knobloch, Sharples, & Peregrina, 2013).

A introdução das resinas bis-acrílico teve como objetivo ultrapassar os inconvenientes das resinas à base de metacrilatos, como por exemplo uma reação de polimerização menos exotérmica o que é vantajoso para a polpa dentária e para o periodonto, provocando assim menos reações adversas nestes (Mathur, et al., 2013). Segundo Ayuso-Montero *et al* (2013), estas resinas demonstram ter melhor resistência à fratura e mastigação, bem como à coloração por solventes da dieta, força de flexão, contorno e adaptação marginal melhor, visto terem menor contração de polimerização.

### **1.2.3 PROPRIEDADES**

#### **1.2.3.1 PROPRIEDADES MECÂNICAS**

As restaurações provisórias devem permanecer na cavidade oral numa condição satisfatória, por isso devem apresentar propriedades mecânicas suficientes para suportarem as forças mastigatórias, prevenir o descolamento mas permitir a remoção e colocação as vezes que forem necessárias para serem feitos “*try-ins*” da restauração definitiva (Balkenhol, Ferger, Mautner, & Wöstmann, 2007).

Segundo um estudo realizado por Poonacha, Salagundi, Rupesh, & Raghavan (2013), a resina acrílica à base de metacrilatos apresenta uma melhor resistência à flexão bem como maior módulo de elasticidade em comparação com as resinas compostas à base de bis-acrílico e UDMA. Por outro lado, após 24 horas de imersão em saliva artificial estas propriedades diminuem nos metacrilatos e estabilizam até aos 7 dias, enquanto que nas resinas compostas aumentam após as 24 horas, provavelmente pela criação de ligações cruzadas entre os monómero ao longo do tempo.

As restaurações são submetidas a forças mastigatórias multidireccionais necessitando de terem uma boa estabilidade marginal para que a fratura desta zona não ocorra. Estudos realizados por Kim & Watts, 2004 demonstraram que os materiais à base de dimetacrilatos (resinas compostas) apresentam melhor resistência às forças mecânicas, principalmente estabilidade marginal quando comparados com os metacrilatos (PMMA e PEMA), apoiando o facto de que a estrutura tridimensional dos dimetacrilatos ser mais favorável que a estrutura dos metacrilatos, visto que as moléculas poliméricas dos metacrilatos movimentam-se com alguma facilidade e diminuem as forças mecânicas.

As diferentes composições do material, tipos, tamanhos e distribuição das partículas de carga bem como a quantidade de ligações duplas dos monómeros e tipo de polimerização influenciam as propriedades mecânicas dos materiais (Balkenhol, Ferger, Mautner, & Wöstmann, 2007).

### **1.2.3.2 PROPRIEDADES ESTÉTICAS**

As coroas provisórias são um elemento importante no diagnóstico estético da restauração definitiva, e quanto mais complexa é a reabilitação mais importante se torna que esta fase seja bem elaborada para que vá ao encontro das expectativas do paciente. Através de um *mock up* feito com um material provisório é possível alterar a forma dos dentes simulando a restauração definitiva e assim ganhar a confiança do paciente e perceber quais as expectativas deste, e facilita também a comunicação com o técnico de prótese dentária para a execução de uma prótese definitiva (Burns, Beck, & Nelson, 2003; Higashi, Gomes, Kine, Andrade, & Hirata, 2009).

Nestas restaurações provisórias, a estabilidade de cor é uma grande preocupação, sobretudo se são feitas em zonas estéticas e se permanecem na boca durante um longo período de tempo. Independentemente da constituição química os materiais tendem a absorver as moléculas ou íons de líquidos como por exemplo café, chá, medicamentos, clorhexidina levando a uma modificação da cor. Haselton, Diaz-Arnold, & Dawson em 2005 demonstraram que as resinas à base de metacrilato sofrem menos alterações de cor do que as resinas compostas, nomeadamente as resinas bis-acrílico.

As variações químicas das resinas, tais como distribuição do tamanho das partículas de polimetil metacrilato, polaridade dos monómeros, estabilidade dos pigmentos e a eficiência do sistema iniciador influenciam o grau de polimerização, adsorção de água e consequentemente a estabilidade da cor (Gujjari, Bhatnagar, & Basavaraju, 2013).

A superfície das restaurações provisórias deve permitir um bom polimento e acabamento final para evitar a acumulação de placa bacteriana e consequente inflamação gengival, além de permitir uma superfície mais estética. As coroas de metil metacrilato têm demonstrado um melhor polimento e superfícies mais lisas do que as coroas de resina bis-acrílico (Sen, Göller, & Issever, 2002).

### **1.2.3.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

As restaurações devem ser realizadas com o intuito de manter ou melhorar a saúde pulpar, periodontal e dos tecidos dentários durante o tempo de preparação dos dentes e da restauração definitiva. A saúde dos tecidos é influenciada pela confecção das restaurações provisórias. Estas devem apresentar uma margem gengival bem adaptada, um contorno correto, superfícies lisas e não podem ser tóxicas para os tecidos (Givens, Neiva, Yaman, & Dennison, 2008). Se as gengivas não estiverem saudáveis é muito mais difícil as etapas subsequentes tais como, impressões e cimentação visto que os tecidos se encontrarão inflamados, hemorrágicos e inviabilizando a obtenção de um correto contorno dos tecidos necessários para a restauração estética (Gegauff & Holloway, 2006).

Respostas inflamatórias dos tecidos pulpare dentários são comuns devido ao desgaste dos dentes e consequente exposição dos túbulos de dentina aquando da preparação do dente, bem como consequência do aumento de temperatura provocado pelos instrumentos rotatórios. Os tecidos devem por isso ser protegidos com uma restauração provisória adequada com uma margem gengival adaptada para proteger a polpa de agressões térmicas, bacterianas e químicas (Burns, Beck, & Nelson, 2003; Gegauff & Holloway, 2006).

As reações de polimerização exotérmicas das resinas utilizadas podem provocar também reações adversas nos tecidos periodontais e pulpare, devendo por isso ser evitados materiais que apresentem reações de polimerização com um grande aumento de temperatura. Segundo, Michalakis *et al* (2006) o material que apresenta maior valor de reação exotérmica é o PMMA, enquanto que as resinas bis-acrílico são as que apresentam menor valor. Este autor refere também, que um aumento de 2,3°C produz mudanças pulpare mínimas, enquanto que um aumento de temperatura de 5,6°C provoca respostas pulpare graves como destruição de odontoblastos e deslocamento de núcleos no interior dos túbulos de dentina.

### **1.3 RELAÇÃO DAS COROAS PROVISÓRIAS COM O PERIODONTO**

Durante a fase provisória, devem ser evitadas lesões nos tecidos periodontais para ser possível alcançar um melhor perfil de tecido mole ao redor da prótese definitiva e posteriormente estética. A colocação de restaurações provisórias resinosas que estão em contacto íntimo com os tecidos periodontais podem provocar irritação ou até mesmo doença periodontal, principalmente quando estas são colocadas subgengivalmente (Borzangy, Labban, & Windsor, 2013).

Têm sido descritas na literatura reações inflamatórias resultantes de substâncias tóxicas dos materiais dentários, nomeadamente dos materiais provisórios resinosos que potencialmente provocam inflamação gengival, colapso das fibras de colagénio, separação do epitélio, perda de osso alveolar e subsequentemente recessão gengival (Luthardt, Stöbel, Hinz, & Vollandt, 2000) (figura 1).

Os fibroblastos são o tipo celular predominante no tecido do periodonto conectivo, tendo como função remodelar a matriz extracelular através das fibras de colagénio, e adicionalmente respondem a várias citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, que controlam o balanço entre a síntese e degradação da matriz extracelular (Labban, Song, Al-Shibani, & Windsor, 2008).



**Figura 1.** Recessão gengival associada a coroas provisórias (Goldberg, Higginbottom, & Wilson, 2008).

Histologicamente o periodonto é constituído por duas áreas distintas: o epitélio sobrejacente e o tecido conectivo subjacente. Tanto a gengiva inserida como a gengiva marginal livre estão cobertas por epitélio escamoso estratificado queratinizado. O sulco gengival e a gengiva aderida são locais onde se pode originar inflamação gengival e eventualmente doenças periodontais. A degradação de colagénio na junção dento-epitelial inicia a formação de bolsas periodontais e recessão gengival (Borzangy, Labban, & Windsor, 2013).

Segundo, Shor, Shuler, & Goto (2008) as restaurações provisórias desempenham um papel importante na integração dos implantes e manutenção dos tecidos moles visto que a sua colocação pós-extração proporciona uma manutenção da morfologia dos tecidos. Há evidências segundo, Zhang, Liao, Mo, Li, Li, & Wang (2008) que a mucosa oral pode ser irritada devido aos monómeros das resinas autopolimerizáveis, quando a

aplicação é local, podendo causar inflamação e retração gengival especialmente imediatamente após a colocação de implantes, comprometendo assim a saúde da mucosa nesta zona e a estética.

As propriedades dos materiais à base de resina colocados na cavidade oral dependem de fatores endógenos causados pela polimerização, como o grau de conversão dos monómeros constituintes, do método e condições de polimerização e de fatores exógenos dependentes das condições na cavidade oral como, saliva, mastigação e bactérias. Estes fatores ao interagirem desencadeiam uma resposta biológica complexa, provocando um efeito tóxico associado à presença de monómeros livres resultantes da polimerização ou da degradação destes materiais na cavidade oral (Ivkovic, Bozovic, Ristic, Mirjanic, & Jankovic, 2013).

Segundo Chaves, et al. (2010), os monómeros não polimerizados influenciam a biocompatibilidade dos materiais resinosos, sendo responsáveis por irritação química local, hipersensibilidade, sinais de inflamação da mucosa, vesiculação, ulceração e em casos mais graves reações alérgicas sistêmicas.

Os monómeros residuais dos materiais resinosos também provocam irritação dos tecidos periodontais, levando à necrose dos tecidos, inflamação e recessão gengival à volta dos dentes a restaurar (Moharamzadeh, Noort, Brook, & Scutt, 2007; Borzangy, Labban, & Windsor, 2013).

Está demonstrado que o rácio de monómero é uma das variáveis que influencia a citotoxicidade e o nível de monómero residual, tem sido observado que resinas preparadas com proporções elevadas de polímero (5:3) resultam em baixos níveis de monómero residual quando comparados com baixos níveis de rácio (4:3) que apresentam altos níveis de monómero residual. Assim, quanto mais monómero adicionado, maior vai ser a quantidade de monómero residual e consequentemente mais citotoxicidade (Ivkovic, Bozovic, Ristic, Mirjanic, & Jankovic, 2013).

## **2. TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE**

Biocompatibilidade ou bioaceitação, consiste como anteriormente foi referido na capacidade de um material desenvolver uma resposta biológica apropriada quando em contacto com os tecidos vivos ou fluídos orgânicos. A interação que ocorre na interface material/tecido é dinâmica e depende de alguns fatores como: local a ser utilizado o biomaterial, as propriedades do material bem como as respostas do hospedeiro (Anusavice, 2012).

Um dos problemas apresentados pelos materiais utilizados em medicina dentária está relacionado com a biocompatibilidade, visto que nenhum material é totalmente inerte do ponto de vista biológico contendo componentes potencialmente tóxicos quando em contacto com os tecidos e fluídos corporais durante períodos de tempo variáveis. Assim sendo, os materiais com uso clínico devem ser testados em condições que simulem situações biológicas que permitam avaliar as respostas obtidas (Vital, Silva, Souza, Ferreira, & Vital, 2008).

Desenvolveram-se e padronizaram-se uma bateria de testes para mensurar a biocompatibilidade dos materiais, estando divididos em teste *in vitro* que são os primeiros a serem realizados, depois os testes *in vivo* e só depois os testes de uso ou de aplicação realizados em animais ou humanos (Anusavice, 2012).

A *International Organization Standardization (ISO)* e o *Council on Dental Materials Instruments and Equipment of the American Dental Association* recomendam a realização de vários testes *in vitro*, visto acreditarem que não há apenas um teste capaz de definir a biocompatibilidade.

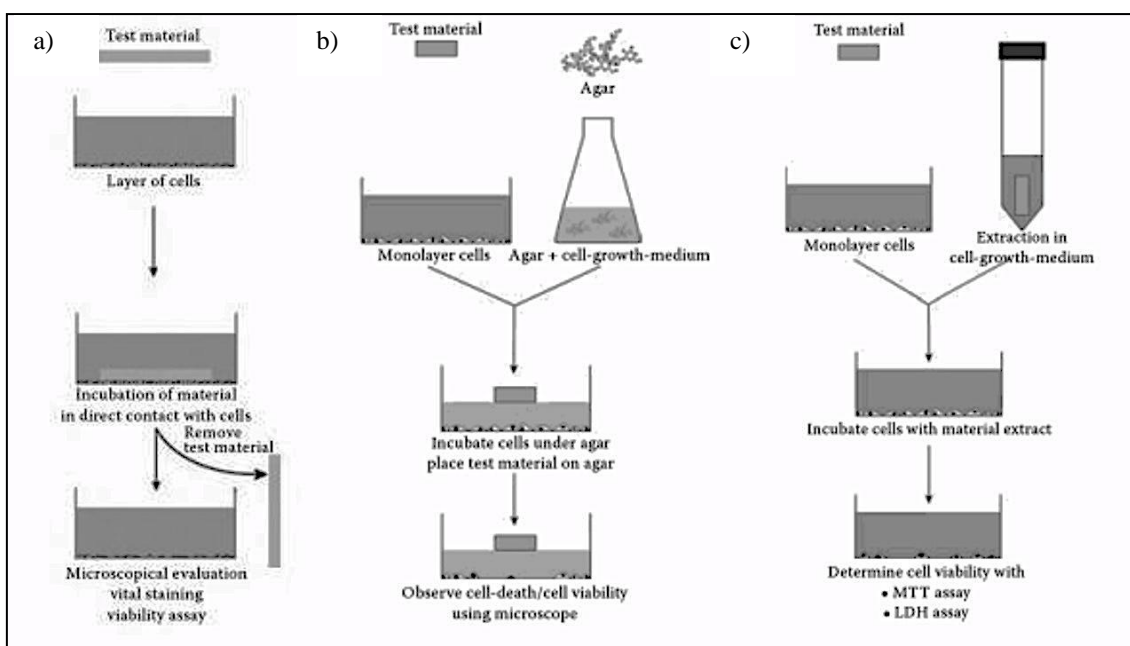
De acordo com a norma ISO 10993, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são os primeiros testes que devem ser realizados para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e só depois de comprovada a sua não toxicidade é que se devem realizar os ensaios de biocompatibilidade do material *in vivo* (Rogero, Lugão, Ikeda, & Cruz, 2003).

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar culturas de células derivadas de tecidos animais ou humanos em contacto com os materiais ou os seus extratos durante



um período de tempo determinado e subsequentemente uma avaliação de uma série de diferentes parâmetros (Schmalz & Arenholt-Bindslev, Basic Aspects, 2009; Chaves, Machado, Vergani, Souza, & Giampaolo, 2012).

O desenho experimental do contacto entre as células e o material é de grande importância para avaliar os materiais biologicamente, este contacto pode ser direto, indireto ou através de diluições dos extratos dos materiais (figura 2). Nos testes de contacto direto o material está em contacto físico com as células ou cultura de células e estas crescem no meio de cultura com o material a testar enquanto que no contacto indirecto o material está separado das células por uma barreira física permeável, sendo este método independente do estado físico do material. O contacto entre os materiais insolúveis e as células pode ser estabelecido usando um agente emulsionante como por exemplo o meio de cultura das células, o dimetilsulfóxido ou etanol em que o material está em contacto com estes agentes libertando os seus compostos tóxicos e posteriormente o extrato libertado é colocado em contacto com as células (Moharamzadeh, Brook, & Noort, 2009)



**Figura 2.** Tipo de contacto entre as células e o material a ser testado; a) contacto direto; b) Contacto indireto; c) Extrato do material (Knetsch, 2013).

A obtenção dos extratos pode ser influenciada por diversos fatores tais como, o tipo e o volume do meio (solvente), tamanho da amostra, o tempo e a temperatura para a extração (Jorge, Giampaolo, & Pavarina, 2004).

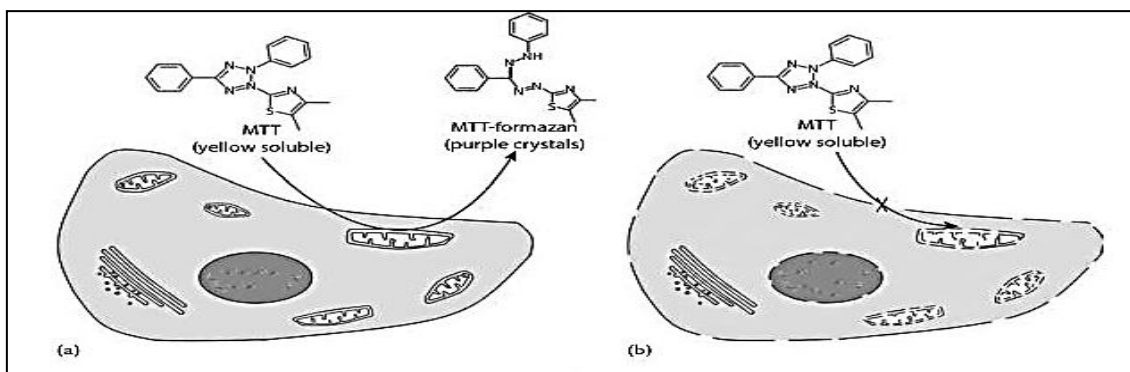
Para avaliar a citotoxicidade podem ser então realizadas análises quantitativas ou qualitativas. Na análise quantitativa após o contacto para identificar proliferação ou inibição celular é determinado o número de células, número de colónias formadas, podendo a quantificação do número de células ser determinado por contagem dos componentes celulares como proteínas, mitocôndrias ou material genético; as análises qualitativas avaliam as células microscópicamente observando as alterações morfológicas (Jorge, Giampaolo, & Pavarina, 2004).

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser medida com o auxílio de corantes vitais como o MTT, vermelho neutro, cristal violeta, *tripan blue*, teste de LDH e o teste de BrdU (Moharamzadeh, Brook, & Noort, 2009).

## **2.1 TESTE DE REDUÇÃO DO MTT**

O teste colorimétrico do MTT descrito por Mosmann em 1983, tem sido largamente utilizado para mensurar a viabilidade celular, e tem sido um teste citotóxico muito utilizado na pesquisa da biocompatibilidade dos materiais dentários (Meerloo, Kaspers, & Cloos, 2011).

Este teste envolve a capacidade de células viáveis converterem metabolicamente o sal de cor amarela de tetrazolium, brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) solúvel em água num precipitado insolúvel de cor púrpura, o formazan, pela a atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase presente no complexo II como demonstrado na figura 3 (Wang, et al., 2010).



**Figura 3.** Redução do MTT a formazan pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (Knetsch, 2013).

Os cristais de cor púrpura de formazan formados são posteriormente dissolvidos por solventes orgânicos, como o Dimetilsulfóxido (DMSO), e a densidade ótica resultante da solução formada é quantificada por espectrofotometria UV/visível detetada a 300 nm (Twentyman & Luscombe, 1987; Ishiyama, et al., 1996).

A viabilidade celular é proporcional à quantidade de sal reduzido e consequentemente quanto maior for a absorvância espectrofotométrica maior o número de cristais de formazan formados pela atividade mitocondrial e portanto maior o número de células viáveis na cultura celular ou seja, menor o número de células que terão sofrido alterações pelos produtos tóxicos (Knetsch, 2013).

## 2.2 TESTE DE CRISTAL VIOLETA

O teste de cristal violeta (CV) é um teste colorimétrico que permite quantificar o DNA nuclear e o número de células. Consiste num corante com capacidade de atravessar as membranas celulares que se vai acumular no núcleo das células viáveis. O corante acumulado é solubilizado e medido fotometricamente. O número de células é então correlacionado com a quantidade de DNA nuclear corado, e quanto maior for a densidade ótica maior o número de células viáveis (Ishiyama, et al., 1996; XENOMETRIX, 2014).

Segundo, Chiba, Kawakami & Tohyama (1998) é um ensaio simples e reprodutível para determinar a citotoxicidade, mas por outro lado é pouco específico devendo por isso ser utilizado em conjunto com outros testes de viabilidade celular como por exemplo o MTT ou o vermelho neutro.

O objetivo do presente trabalho consiste na caracterização e comparação do efeito citotóxico de três resinas utilizadas na execução de coroas provisórias: Protemp 4<sup>TM</sup> - 3 M ESPE (bis-acrílico), Structur 3<sup>®</sup> - VOCO (dimetacrilato de uretano) e Tab 2000<sup>®</sup> - KERR (PMMA, resina acrílica autopolimerizável de polimetil metacrilato), quando em contacto com fibroblastos.

Para a determinação da citotoxicidade destes materiais serão utilizados os ensaios de MTT e de cristal violeta que permitem quantificar a viabilidade celular, ou seja, o número de células viáveis após contacto entre as resinas e as células.

### 3. OBJECTIVO

Com o presente estudo pretende-se:

Observar e comparar *in vitro*, o efeito citotóxico de três tipos de resinas acrílicas: Resina bis-acrílico (Protemp 4<sup>TM</sup>), resina à base de dimetacrilato de uretano (Structur 3<sup>®</sup>) e resina de PMMA (Tab 2000<sup>®</sup>) quando em contacto com fibroblastos da linha celular 3T3 de murganho.

### 4. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

#### **Hipótese Nula:**

Não há diferença nas reações de citotoxicidade dos fibroblastos da linha celular 3T3 de murganho quando em contacto com as resinas bis-acrílico (Protemp 4<sup>TM</sup>), resina à base de dimetacrilato de uretano (Structur 3<sup>®</sup>) e resina de PMMA, resina acrílica autopolimerizável de polimetil metacrilato (Tab 2000<sup>®</sup>).

#### **Hipótese Alternativa:**

Há diferença nas reações de citotoxicidade dos fibroblastos da linha celular 3T3 de murganho quando em contacto com as resinas bis-acrílico (Protemp 4<sup>TM</sup>), resina à base de dimetacrilato de uretano (Structur 3<sup>®</sup>) e resina de PMMA, resina acrílica autopolimerizável de polimetil metacrilato (Tab 2000<sup>®</sup>).

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. MATERIAIS

#### 1.1. Resinas

Para este trabalho foram testadas três tipos de resinas utilizadas para a execução de restaurações provisórias em prótese fixa: Protemp 4<sup>TM</sup> - 3 M ESPE (bis-acrílico), Structur 3<sup>®</sup> - VOCO (dimetacrilato de uretano) que são resinas compostas e Tab 2000<sup>®</sup> - KERR (PMMA, resina acrílica autopolimerizável de polimetil metacrilato).

As resinas foram manipuladas de acordo com as instruções do fabricante. No caso do Protemp 4<sup>TM</sup> e do Structur 3<sup>®</sup> são fornecidas as pistolas e pontas de auto-mistura e no caso do Tab 2000<sup>®</sup> houve manipulação no copo fornecido pelo fabricante, com uma espátula reta dupla de metal (ASA DENTAL, 0903- 2) esterilizada (autoclavada).



**Figura 4.** a) Protemp 4<sup>TM</sup> - 3 M ESPE; b) Structur 3<sup>®</sup> - VOCO; c) Tab 2000<sup>®</sup> - KERR  
(3M, 2014; VOCO, 2012 ;Kerr, 2011)

**Tabela 1.** Resinas utilizadas no presente trabalho (3M, 2014; VOCO, 2012; Kerr, 2011).

Nome do produto	Lote	Ingredientes*		Indicações
<b>PROTEMP 4™</b> (3M ESPE, St. Paul MN, USA)  Resina composta à base de bis-acrílico	535118	<i>Pasta Base:</i> - Bisfenol A-dimetacrilado de etoxilato (EBPDMA); - Sílica silanizada	<i>Pasta catalisadora:</i> - Produtos da hidrólise da sílica; - Ácido barbitúrico fenil-5-benzil-1 - Trimetilperoxihexonato - 3,5,5,-tributil	- Confeção de coroas, pontes, inlays, onlays e Veneers (coroas de revestimento) provisórias; - Provisórias de longa duração; - Rebasamento de coroas provisórias pré-fabricadas em compósito
<b>STRUCTUR 3®</b> (VOCO)  Resina composta à base de dimetacrilato de uretano	1221295	<i>Pasta Base:</i> - Dimetacrilato de uretano	<i>Pasta Catalisadora:</i> - Dimetacrilato de uretano; - Bis-GMA; - Peróxido de Benzoíla.	- Confeção de coroas, pontes, inlays, onlays, coroas parciais, facetas e “pivots” provisórios. -Confeção de provisórios de longa duração -Rebasamento de coroas provisórias pré-fabricadas em compósito, policarbonato ou metal
<b>Tab 2000®</b> KERR Resina acrílica autopolimerizável de polimetil metacrilato (PMMA)	45551B3	<i>Líquido:</i> Monômero de metilmetacrilato Dimetacrilato de etileno N,N dimetil p-toluidina (DMPT) Hidroquinona	<i>Pó:</i> -Polímero de metilmetacrilato - Dietilftalato.	- Confeção de coroas e pontes provisórias; -Rebasamento e reparação de coroas provisórias

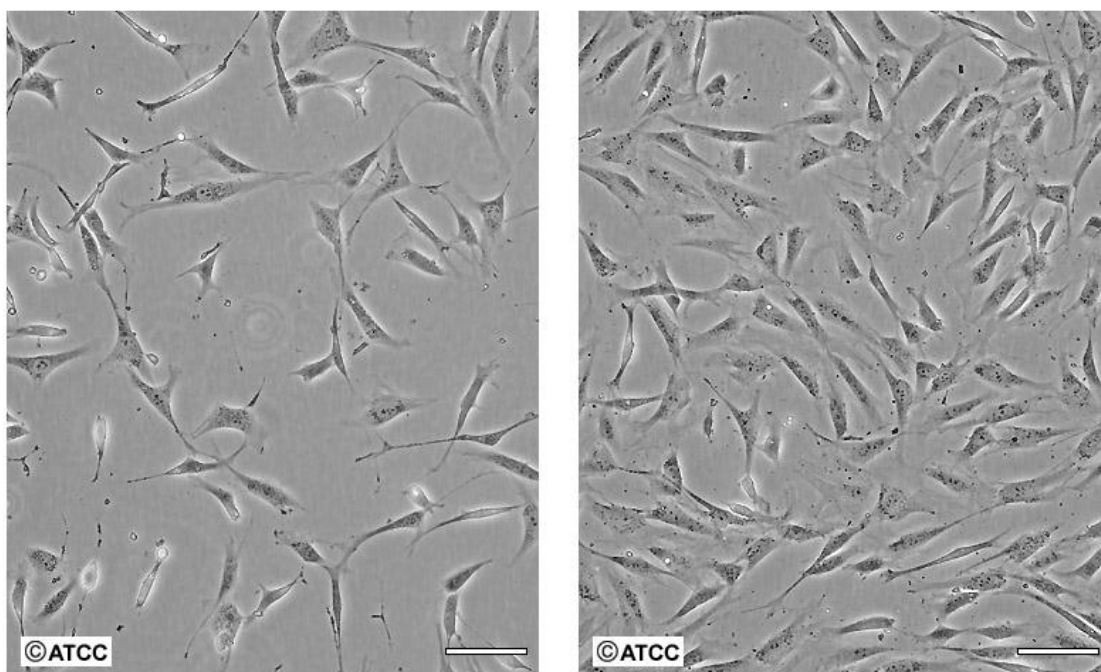
\* Segundo ficha MSDS de cada produto

## 1.2. Linha Celular

Para o presente estudo foi utilizada uma linha celular obtida a partir de fibroblastos embrionários de murganho (NIH/3T3 ATCC® CRL-1658<sup>TM</sup>), que se caracterizam pelo crescimento aderente em monocamada.

Esta linha celular foi isolada pela primeira vez em 1962 por George Todaro e Howard Green no departamento de patologia da Universidade de Medicina de Nova Iorque e tornou-se uma linha celular imortalizada, permitindo a sua multiplicação indefinida padronizada, utilizada largamente em testes *in vitro* de biocompatibilidade devido ao comportamento semelhante com as células *in vivo* (ATCC, 2014).

As células 3T3 em cultura (figura 5) apresentam uma forma fusiforme com núcleo central e prolongamentos citoplasmáticos.



**Figura 5.** Células 3T3 observadas ao M.O (ATCC, 2014).



### 1.3. Reagentes

**Tabela 2.** Reagentes utilizados no presente trabalho

Reagente	Fonte	Referência
Ácido acético	VWR	20105.292
Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT); 99%	Sigma, Reino Unido	M5655
Cristal violeta	Sigma,	
Dimetilsulfóxido (DMSO); 99% puro	Merck, EUA	317275
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM); filtrado-esterilizado; testado para endotoxinas	Sigma, Reino Unido	D5671
Etanol	Merck, EUA	
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS), filtrado-esterilizado; testado para endotoxina e hemoglobina	Sigma, USA	F4135
Gentamicina 50mg/ml	Gibco, Reino Unido	15750037
Giemsa (Eosina azul de metileno)	Merck, EUA	1092030100
<i>MEM Non-essential Amino Acid Solution</i> 100x; filtrado-esterilizado; testado para endotoxinas	Sigma, Reino Unido	M7145
Metanol; 99,8%	Sigma, Reino Unido	32213
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato PBS); 10x pH 7,2	Gibco, Reino Unido	70013-016
Solução de anfoterizina B 250 µg/ml (Fungizona); filtrado-esterilizado	Sigma, Reino Unido	A2942
Solução de <i>Tripan Blue</i> (0,4%); filtrado-esterilizado	Sigma, Reino Unido	T8154
Solução L-glutamina-penicilina-streptomicina (200 mM L-glutamina, 10000 U/ml Penicilina, 10 mg/ml Streptomicina); filtrada-esterilizada (penstrep-glu)	Sigma, Reino Unido	G6784
Tripsina de pâncreas suíno; filtrado-esterilizado; 10x pH 6,4-7,0	Sigma, Reino Unido	15090046

#### **1.4. Equipamentos do laboratório de cultura de células**

**Tabela 3.** Equipamentos do laboratório de cultura de células.

<b>Equipamento / Modelo</b>	<b>Marca</b>
Câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2	LaboGene, Dinamarca
Câmara de Neubauer modelo 8100104	Hirschmann, Alemanha
Centrifugadora modelo 3-16 K	Sigma
Incubadora 2406 SHEL LAB Basic CO <sub>2</sub> Jacketed Incubator	Shel Lab
Leitor de microplacas modelo 680	Bio-Rad, Califórnia
Microscópio óptico Axiovert 25	Zeiss, EUA

Para além dos reagentes descritos na tabela 2 foi utilizada água destilada esterilizada (autoclavada) e todos os materiais comuns à manipulação de culturas celulares, como pipetas, micropipetas e pontas, placas de 6 poços e 96 poços, frascos de cultura 25cm e *falcons*.

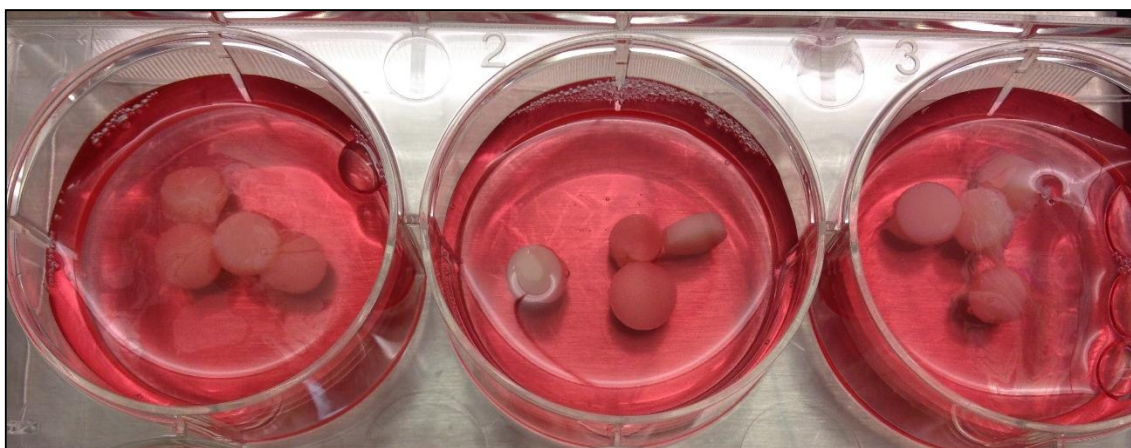
## 2. MÉTODOS

As resinas, células e meio de cultura foram manipulados em condições de assepsia, com material estéril em câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2 (LaboGene, Dinamarca). Todos os materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente estéreis, ou foram esterilizados no próprio laboratório através de um processo de esterilização em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

### 2.1. Preparação das resinas

As resinas utilizadas neste trabalho provinham de embalagens novas e seladas e foram manipuladas de acordo com as instruções do fabricante, e colocadas em formas cilíndricas feitas com silicone de condensação – *putty* com diâmetro de 5 mm e altura de 2 mm, com uma área total de 71 mm<sup>2</sup>.

Para cada ensaio foram utilizados quatro discos de cada resina que após polimerização foram colocados em 7 ml de meio DMEM (figura 6) e incubadas a 37°C (incubadora 2406 SHEL LAB Basic CO<sub>2</sub> Jacketed Incubator, Shel Lab), numa atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub> por um período de tempo variável, dependendo do tipo de ensaio, de modo a permitir a libertação de alguns dos seus constituintes, mimetizando o que acontece na boca.



**Figura 6.** Fotografia dos 4 discos das resinas em 7 ml de DMEM.

Foram atribuídas SIGLAS às resinas para ser mais fácil a sua identificação durante todo o trabalho de laboratório:

- R1 – Protemp 4<sup>TM</sup> ( resina composta de bis-acrílico)
- R2 – Tab 2000<sup>®</sup> (resina de PMMA)
- R3 – Structur 3<sup>®</sup> (resina composta de UDMA)

## **2.2. Cultura de células – Fibroblastos 3T3**

As células 3T3 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Sigma, Reino Unido) suplementado com 10% de soro FBS (Sigma, USA), 1% de PNA 100mM (Gibco, Reino Unido), 1% fungizona 250 µg/mL (Sigma, Reino Unido), 1% MEM 100x (Sigma, Reino Unido), 1% de solução de penstrep-glutamina (Sigma, Reino Unido) e 0,1% de gentamicina 50mg/mL (Gibco, Reino Unido).

As células 3T3 estavam guardadas inicialmente em criotubos congeladas a -80°C em 10% de DMSO, tendo sido descongeladas rapidamente em água a 37°C, às quais se adicionou meio de cultura DMEM suplementado e as células foram transferidas para um frasco de cultura de 75cm<sup>2</sup> (T75) e adicionado 12 ml de DMEM .

As células foram incubadas a 37°C (incubadora 2406 SHEL LAB Basic CO<sub>2</sub> Jacketed Incubator, Shel Lab), numa atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub> até atingirem uma confluência de 80% (as células ficam aderentes à superfície lateral do frasco T25, e a confluência é calculada a partir das áreas com células vs áreas sem células), tendo o meio de cultura sido substituído a cada três dias. Quando as células estavam com a confluência entre 80% e 90% foram realizadas subculturas com parte das células e as outras células foram congeladas em DMSO para manter um *stock* de células viáveis guardado a -80°C, para utilização futura.

Para congelar as células, foi adicionado ao meio de cultura 10% de DMSO (Sigma, Reino Unido), colocadas num criotubo e congeladas lentamente, dos -20°C até aos -80°C.

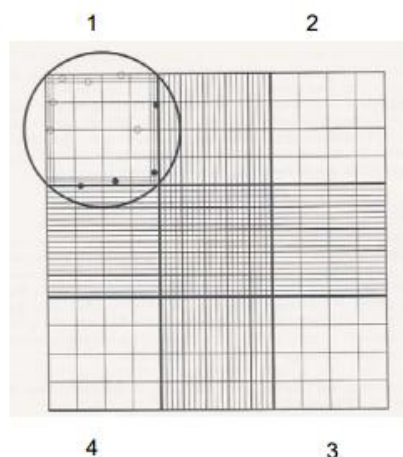
### 2.2.1. Subculturas

O meio de cultura existente na placa de 10 cm ou T25 foi aspirado e as células lavadas com PBS a 1x (tampão fosfato) duas vezes, e logo de seguida fez-se o tratamento com tripsina (1 ml de tripsina a 0,25 mg/ml) para hidrolisar as proteínas de adesão possibilitando o destacamento e recolha das células.

A tripsinização decorreu a 37°C, na incubadora durante 3 minutos, após os quais foi adicionado meio de cultura suplementado para parar esta reação (3 vezes o volume de tripsina). As suspensões celulares foram centrifugadas durante 3 minutos a 1500 rpm (centrifugadora Sigma, modelo 3-16 K). O sobrenadante é descartado e as células foram ressuspensas no pequeno volume de meio restante e adicionado meio de cultura suplementado até ao volume final de 3 ml.

O número de células foi calculado, utilizando uma câmara de Neubauer modelo 8100104 Hirschmann Neubauer-improved (Hirschmann) como representado na figura 7 adicionando 10µl de suspensão de células a 10µl de uma solução de *Trian Blue*, em que o número de células em 1ml é calculado por:

$\text{Nr de células/mL} = \frac{\text{média do n}^\circ \text{ de células contadas por quadrante(3 contagens)}}{3} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$
--



**Figura 7.** Câmara de Neubauer (BMM 5777 – Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia).

As subculturas foram mantidas rotineiramente em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (T25 – Sarstedt) com meio de cultura DMEM suplementado e as células foram subcultivadas (passadas) 10 a 20 vezes, o que significa que os testes de viabilidade celular foram realizados quando as células 3T3 tinham entre 10 a 20 passagens.

### **2.3. Determinação da viabilidade celular**

Para determinar a viabilidade celular foi utilizado o ensaio de redução do MTT e o ensaio do cristal violeta.

O ensaio do MTT baseia-se na redução de um sal de cor amarela, num produto de cor púrpura, o formazan, pelas enzimas succinato desidrogenase presentes na membrana interna das mitocôndrias intactas de células viáveis. Uma vez que só nas células viáveis estas enzimas mantêm a sua posição na membrana que permite o contato com o sal que se acumulou na matriz mitocondrial, estando por isso diretamente relacionado o número de células vivas com a concentração de formazan formado após contacto das células com um produto tóxico. Este ensaio é largamente utilizado para ensaios *in vitro* de citotoxicidade.

Os valores de absorvância dos cristais de formazan são determinados por espectrofotómetro após serem solubilizados num solvente orgânico, DMSO, e estão relacionados com o número de células viáveis, como explicado anteriormente.

O ensaio do cristal violeta é utilizado como um ensaio confirmatório dos resultados do ensaio do MTT, visto que também permite determinar o número de células viáveis a crescer em monocamada, pela coloração do núcleo das células viáveis. O cristal violeta é um corante que tem a capacidade de se ligar ao DNA presente nas células vivas que estão aderentes às placas. A absorvância medida por espectrofotometria reflete o número de células viáveis.

### **2.3.1. Ensaio do MTT**

As células 3T3 são incubadas durante 24 horas com 200 µl do composto eventualmente tóxico determinado para cada ensaio, após esse tempo é retirado o composto que estava em contacto com as células, lavadas com 100 µl meio de cultura e adicionado 200 µl de solução de MTT por poço, numa concentração de 0,5mg/ml, dissolvido em meio de cultura. Após a adição do MTT, a placa é incubada durante 2 horas, a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação a solução de MTT é retirada das placas, as células são cuidadosamente lavadas com 4 gotas de PBS 1x e posteriormente secas, por inversão da placa e remoção do líquido por absorção em papel. Depois de estarem bem secas, adicionam-se 200 µl de DMSO a cada poço para solubilizar os cristais de MTT formados. As placas são lidas num leitor de microplacas Model 680 (Bio-Rad, California) num comprimento de onda de 595 nm.

### **2.3.2. Ensaio do Cristal Violeta**

As células são incubadas por 24 horas com 200 µl do composto determinado para cada ensaio, após esse tempo é retirado o composto que estava em contacto com as células, e os poços lavados com algumas gotas de PBS de forma a remover as células não

aderentes. As células aderentes são fixadas com 100 µl de etanol a 96% gelado durante 10 minutos, após este tempo é removido o etanol e as células são coradas com 100µl de cristal violeta a 0,1% em 10% de etanol durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as células são lavadas com água destilada aquecida até remoção completa do corante das paredes dos poços, ficando apenas no fundo de cada poço da placa as células aderentes coradas. As células aderentes coradas são dissolvidas em 200 µl de uma solução de 96% de etanol com 1% de ácido acético e agitadas durante 30 minutos. As absorvâncias no comprimento de onda de 595nm são mensuradas no espectrofotômetro de microplacas Model 680 (Bio-Rad, California).

Aos valores de absorvância obtidos é subtraída a absorvância dos poços em branco que contêm DMSO no caso do ensaio do MTT e a solução de etanol com ácido acético no ensaio do cristal violeta. Os valores de absorvância dos poços das culturas controle, que correspondem às células incubadas apenas com o meio de cultura, sem o composto tóxico, corresponde a 100% de viabilidade celular.

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{Absorvância com o tóxico}}{\text{Absorvância do controle}} \times 100$$



### **A. Ensaio I: OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS**

Inicialmente, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, com concentrações crescentes de células:  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^3$  e  $5 \times 10^3$  em 200  $\mu$ l de meio de cultura por poço, incubadas a 37°C, com uma atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 horas.

Após as 24 horas de incubação foi retirado o meio de cultura e adicionado novo meio por mais 24 horas.

Passadas as 24 horas de incubação as células foram lavadas com meio de cultura e adicionados 200  $\mu$ l de solução de MTT que incubou durante 2 horas, como descrito anteriormente e foram lidos os resultados de absorvâncias.

Foram realizados dois ensaios experimentais independentes para cada ensaio, com 8 réplicas para cada concentração de células.

### **B. ENSAIO II: Extrato das resinas de 24 horas de libertação em contacto com $4 \times 10^3$ células**

As células foram semeadas em placas de 96 poços, a uma concentração de  $4 \times 10^3$  em 200  $\mu$ l de meio de cultura por poço, incubadas a 37°, numa atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>, por 24 horas. No mesmo período de tempo, foram preparados 4 discos de cada resina que polimerizaram durante o tempo indicado pelo fabricante. Os discos foram depois colocados em 7 ml de meio de cultura em placas de 6 poços e incubados durante 24 horas.

Após as 24 horas, o meio que esteve em contacto com as células foi removido e foi adicionado o meio contendo os extratos das resinas.

O meio que esteve em contacto com as resinas foi filtrado através de filtros de celulose com 0,45 µm de poro e foram feitas diluições sequenciais desses extratos com o meio de cultura como descrito na tabela 4 (Nascimento, 2013).

**Tabela 4.** Diluições realizadas no ensaio II

<b>Diluição Final</b>	<b>µl de extrato das resinas</b>	<b>µl de DMEM suplementado</b>	<b>Volume total µl</b>
<b>1</b>	200	0	200
<b>1:1,25</b>	150	50	
<b>1:2</b>	100	100	
<b>1:4</b>	50	150	
<b>1:8</b>	25	175	
<b>1:20</b>	10	190	

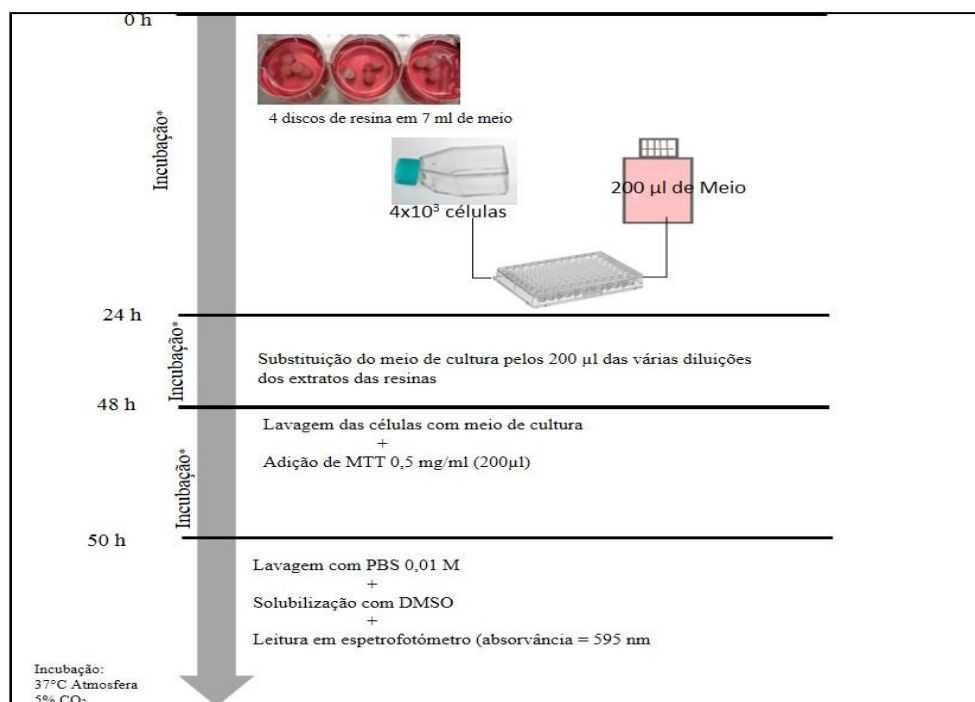
Para cada diluição dos extratos foi utilizada 1 coluna, com 8 poços. A cada poço com as células aderentes foi adicionado um volume total de 200 µl de cada diluição;

Estas condições foram repetidas para todos os tipos de resinas;

Como branco de controlo foi utilizada 1 coluna de 8 poços nos quais foram colocados apenas 200 µl de DMEM suplementado;

Após as 24 horas de incubação com o composto, as células foram lavadas com meio de cultura e foram adicionados 200 µl de solução de MTT, como descrito anteriormente e foram lidos no espectrofotómetro (figura 8).

Foram realizados 3 ensaios experimentais independentes, cada um com 8 réplicas para cada diluição das diferentes resinas, bem como o ensaio confirmatório do cristal violeta nas mesmas condições.



**Figura 8.** Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no ensaio II (imagens de Inforlab (2014) e Basprix (2014)).

### **B - I. Coloração de Giemsa das células 3T3 em contacto com o extrato da resina R3 após 24 horas de libertação**

As células foram semeadas sobre lamelas colocadas no fundo dos poços de placas de cultura de 6 poços a uma concentração de  $2 \times 10^5$  em 4 ml de meio de cultura, e incubadas a 37°, numa atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 horas.

Ao mesmo tempo a R3 foi preparada (4 discos), e após a polimerização foram colocados em 7 ml de meio de cultura e incubados pelo mesmo período de tempo que as culturas celulares. Após as 24 horas todo o meio que esteve em contacto com a resina foi aspirado e filtrado através de filtros de celulose com 0,45 µm de poro e adicionado às células, depois de retirar por aspiração todo o meio que estava em contacto com as células. Para cada ensaio foram utilizados poços com o mesmo número de células, um em que as células foram postas em contacto com o extrato incubado com resina e um outro poço de controlo em que se adicionou apenas meio de cultura suplementado.

Passadas as 24 horas as lamelas com as células aderentes foram retiradas dos poços.

As células foram fixadas às lamelas com metanol (99,8%) durante 5 minutos. Posteriormente, sem secar foi colocado durante 20 minutos uma solução de Giemsa a 10% em tampão fosfato (PBS a 10%) e foi lavado muito bem com água corrente e deixou-se secar. Depois de bem seco foi montado numa lâmina de vidro.

### **ENSAIO III: Extrato das resinas de 48 horas, 72 horas e 5 dias**

Quatro discos de cada resina estiveram em contacto com 7 ml de meio de cultura para libertação dos seus extratos durante 48 horas, 72 horas e 5 dias. Para isso as resinas foram previamente preparadas antes do dia em que as células foram postas em cultura nas placas de 96 poços;

As células foram cultivadas em placas de 96 poços, numa concentração de  $4 \times 10^3$  em 200 µl de meio de cultura por poço, incubadas a 37°, numa atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>, por 24 horas;

Após as 24 horas, foi removido todo o meio que esteve em contacto com as células e foi adicionado o meio dos extratos das resinas que estiveram 48 h, 72 h e 5 dias a libertar os seus extratos tendo sido aspirado na totalidade e filtrado com filtros de celulose com 0,45 µm de poro;

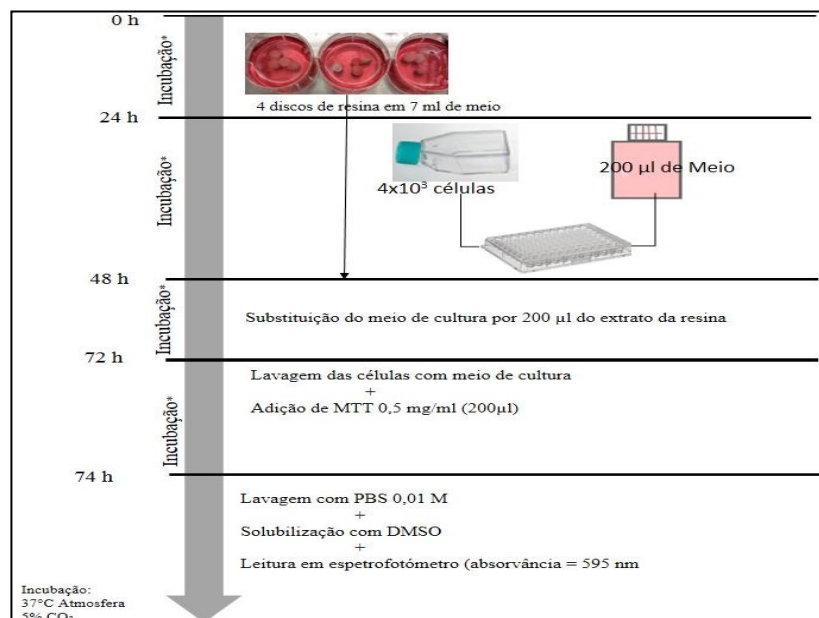
Foi utilizada 1 coluna de 8 poços para cada extrato com diferentes tempos de libertação, com um volume total de 200 µl de cada por poço;

Estas condições foram repetidas para todos os tipos de resinas;

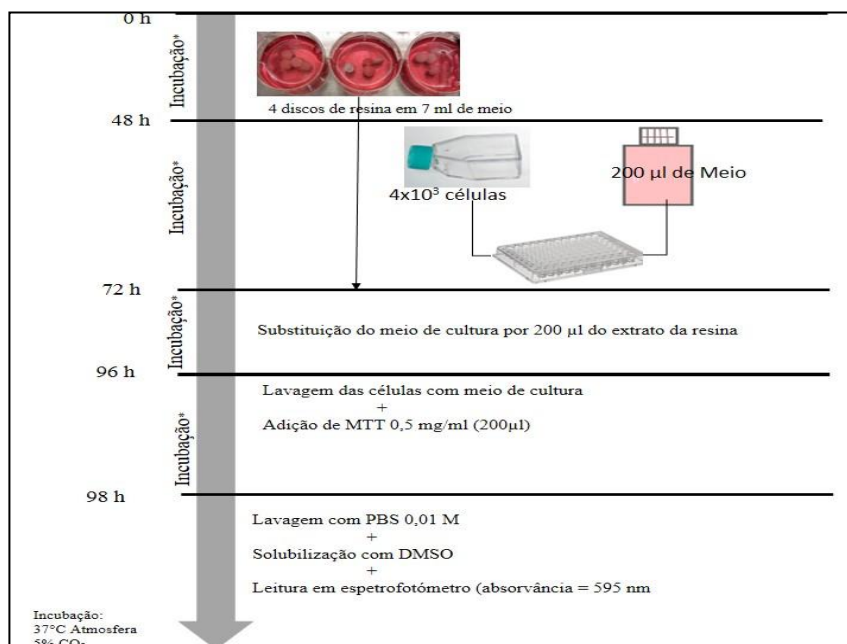
Como branco de controlo foi utilizada 1 coluna de 8 poços em que foi adicionado apenas 200 µl de DMEM suplementado;

Após as 24 horas de incubação com o composto, as células foram lavadas com meio de cultura e foram adicionados 200 µl de solução de MTT, como descrito anteriormente e foram lidos no espectrofotómetro (figura 9, 10 e 11).

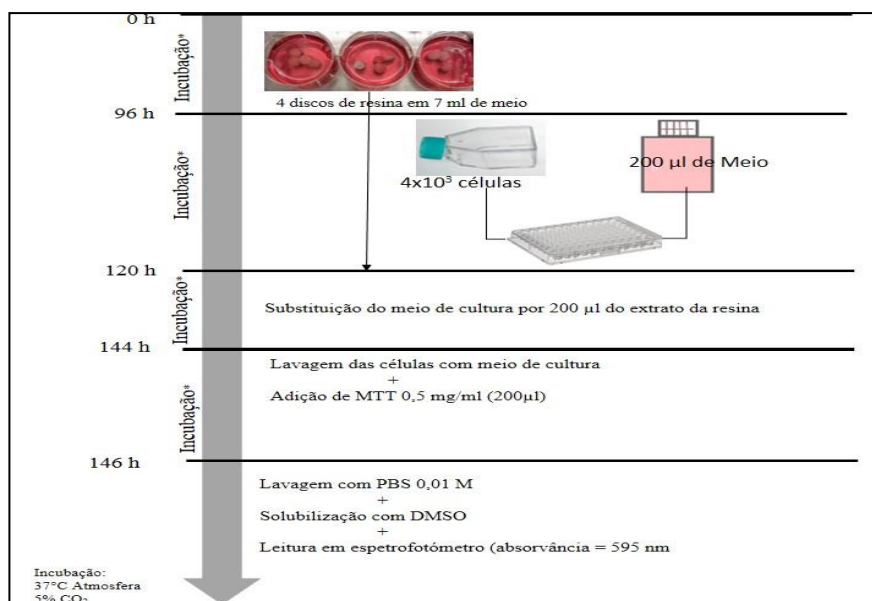
Foram realizados 2 a 3 ensaios experimentais independentes, cada um com 8 réplicas para cada diluição das diferentes resinas, bem como o ensaio confirmatório do cristal violeta nas mesmas condições.



**Figura 9.** Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no ensaio III – período de incubação das resinas de 48 horas (imagens de Inforlab (2014) e Basprix (2014))



**Figura 10.** Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no ensaio III – período de incubação das resinas de 72 horas (imagens de Inforlab (2014) e Basprix (2014))



**Figura 11.** Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no ensaio III – período de incubação das resinas de 5 dias (imagens de Inforlab (2014) e Basprix (2014))

### **3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

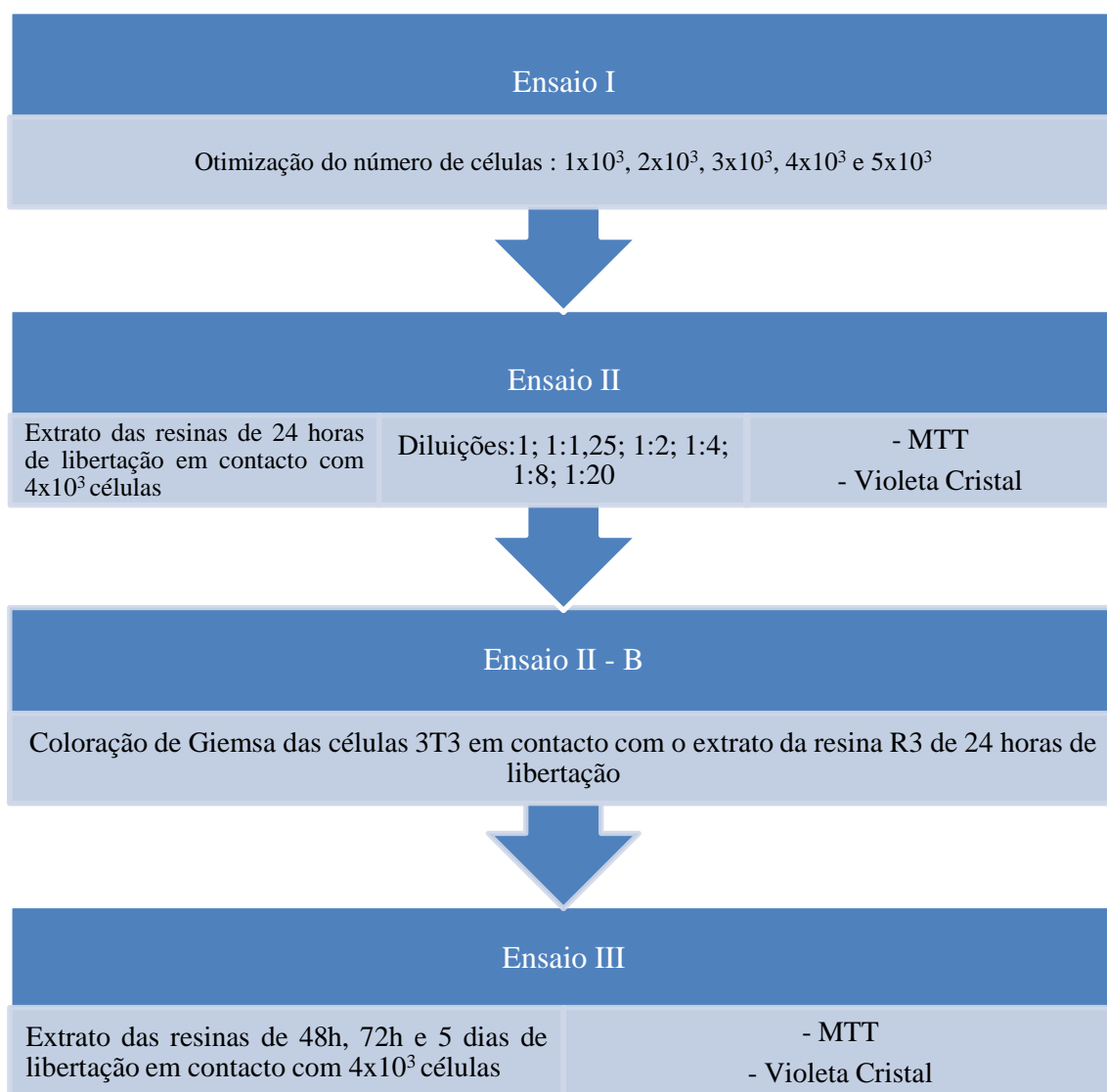
Toda a análise estatística foi realizada no programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 20.0 para Windows.

Foi utilizado o Anova One-way pois estamos a comparar mais de dois grupos e as variáveis dependentes são de tipo quantitativo. Nas situações em que o pressuposto de homogeneidade de variâncias não se encontrava satisfeito usou-se a Anova com a correção de Welch. Para analisar as diferenças significativas utilizaram-se os testes de comparação múltipla de Tukey e de Tamhane.

O nível de significância foi fixado em  $(\alpha) \leq 0,05$ .

### III. RESULTADOS

Ao longo do presente trabalho foram realizados vários ensaios experimentais, que foram ajustados ao longo do tempo dependendo dos resultados que iam sendo obtidos até se conseguir estruturar a sequência de ensaios a realizar (figura 12).



**Figura 12.** Sequência de ensaios realizados

Em todos os ensaios as células foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado, e como controlo de 100% de viabilidade celular foram utilizadas células em contacto apenas com meio de cultura.



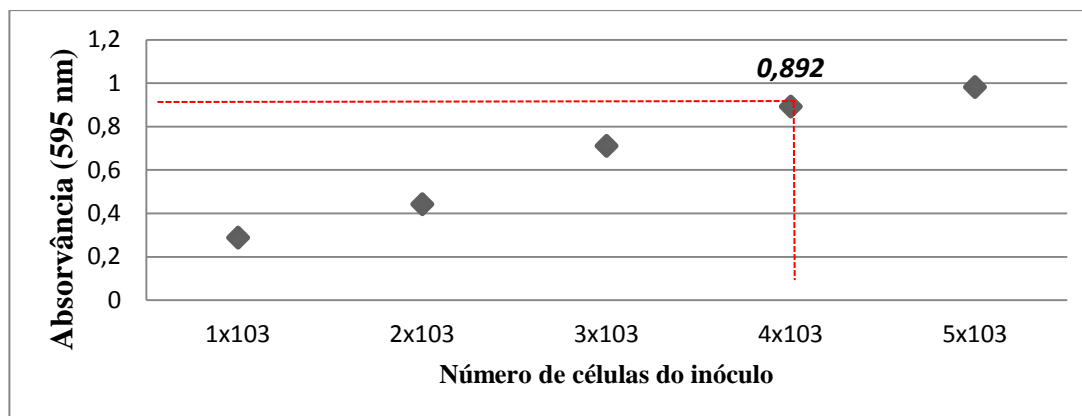
### A. Ensaio I: OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS

Inicialmente, foram semeadas diferentes números de células no mesmo volume de meio de cultura (200µl) para verificar qual o melhor número de células para obter uma redução de MTT mais constante e com valores de absorvância que estivessem dentro da lei de Lambert-beer para o comprimento de onda por nós utilizado (595nm).

- Foram então semeadas nos poços das placas de cultura de 96 poços  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^3$  e  $5 \times 10^3$  de células em 200µl de meio suplementado durante 24 horas;
- Após as 24 horas todo o meio que esteve em contacto com as células aderentes foi retirado e adicionado novo meio de cultura (200µl) e incubado durante mais 24 horas;
- Foi aspirado todo o meio e procedeu-se ao teste de MTT como já descrito anteriormente.

**Tabela 5.** Valores médios de absorvância (595 nm) referentes ao número de células do inóculo  $\pm$  desvios padrão após ensaio de redução do MTT

Número de células do inóculo	Valor médio de absorvância	Desvio Padrão
<b><math>1 \times 10^3</math></b>	0,288	0,03
<b><math>2 \times 10^3</math></b>	0,442	0,00
<b><math>3 \times 10^3</math></b>	0,711	0,08
<b><math>4 \times 10^3</math></b>	<b>0,892</b>	<b>0,05</b>
<b><math>5 \times 10^3</math></b>	0,982	0,09



**Gráfico 1.** Valores médios de absorvância (595 nm) obtidos através do ensaio do MTT referentes ao número de células do inóculo.

Os valores médios de absorvância estão descritos na tabela 5, tendo sido  $4 \times 10^3$  células por poço nas placas de 96 poços o número de células escolhido (gráfico1), uma vez que foi nesta quantidade de células que a absorvância obtida após solubilização dos cristais de formazan estava dentro da lei de Lambert-beer.

## **B. ENSAIO II: Extrato das resinas após 24 horas de libertação**

Neste ensaio foram utilizadas  $4 \times 10^3$  células por poço incubadas durante 24 horas com diluições dos extratos das resinas R1, R2 e R3, após os 4 discos de cada resina terem estado em contacto com 7 ml de meio de cultura por 24 horas.

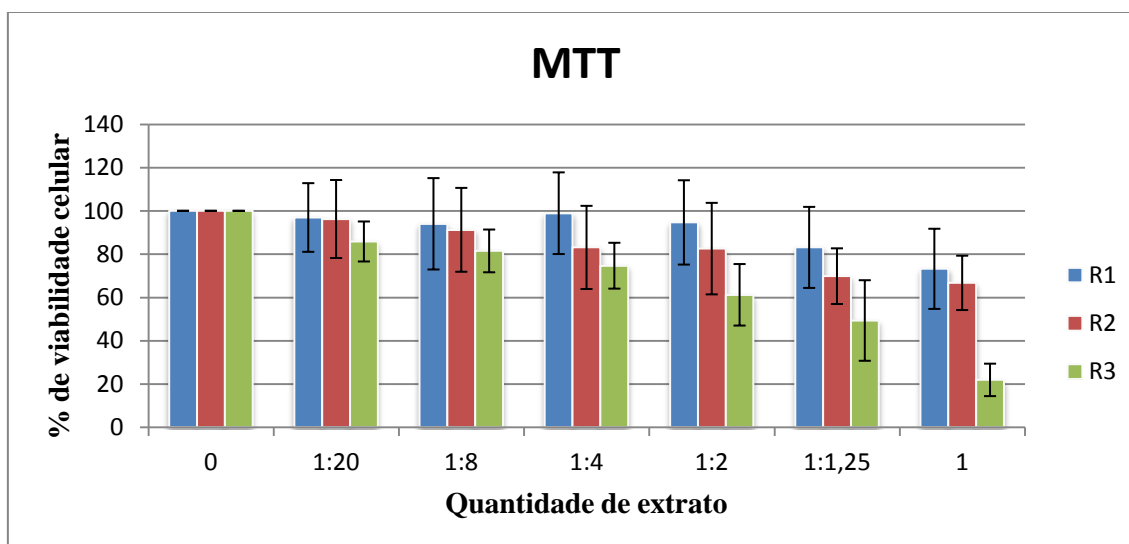
Após as 24 horas de incubação das células com os extratos, foi interrompido este contacto e realizou-se o ensaio de redução do MTT para mensurar a percentagem de viabilidade celular. Os cristais de cor púrpura de formazan formados através da metabolização das enzimas desidrogenases mitocondriais das células viáveis foram solubilizados com DMSO e as placas foram lidas por espectrofotometria num comprimento de onda de 595 nm.

Nas mesmas condições foi realizado o ensaio do violeta cristal, que cora o núcleo das células viáveis.

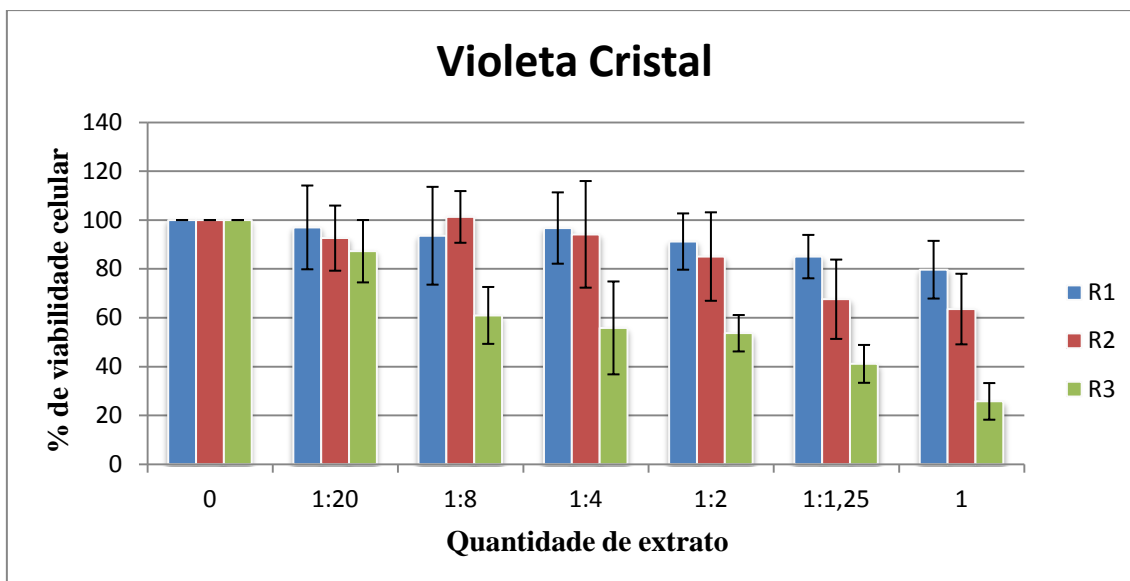
Os valores médios de viabilidade celular estão representados na tabela 6.

**Tabela 6.** Valores médios de percentagem de viabilidade celular após o contacto por 24 horas das diferentes quantidades da resina R1,R2 e R3 referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.

		Quantidade de extrato						
Resinas	Tipo de ensaio	0 (0 extrato + 200 meio)	1:20 (10 extrato + 190 meio)	1:8 (25 extrato + 175 meio)	1:4 (50 extrato + 150 meio)	1:2 (100 extrato + 100 meio)	1:1,25 (150 extrato + 50 meio)	1 (200 extrato + 0 meio)
R1	MTT	100	96,92 $\pm 15,87$	94,01 $\pm 21,11$	98,90 $\pm 18,87$	94,64 $\pm 19,48$	83,10 $\pm 18,72$	73,20 $\pm 18,52$
	VC	100	96,99 $\pm 17,15$	93,57 $\pm 20,02$	96,73 $\pm 14,60$	91,19 $\pm 11,52$	85,03 $\pm 8,88$	79,67 $\pm 11,81$
R2	MTT	100	96,22 $\pm 18,02$	91,22 $\pm 19,37$	83,09 $\pm 19,21$	82,54 $\pm 21,14$	69,81 $\pm 12,86$	66,72 $\pm 12,55$
	VC	100	92,59 $\pm 13,33$	101,28 $\pm 10,59$	94,14 $\pm 21,83$	85,05 $\pm 18,11$	67,57 $\pm 16,24$	63,56 $\pm 14,45$
R3	MTT	100	85,84 $\pm 9,24$	81,48 $\pm 9,88$	74,64 $\pm 10,59$	61,20 $\pm 14,21$	49,33 $\pm 18,61$	21,89 $\pm 7,49$
	VC	100	96,92 $\pm 15,87$	94,01 $\pm 21,11$	98,90 $\pm 18,87$	94,64 $\pm 19,48$	83,10 $\pm 18,72$	73,20 $\pm 18,52$



**Gráfico 2.** Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 após 24 horas de contacto com diferentes quantidades de resina R1, R2 e R3 determinado pelo ensaio de redução do MTT  $\pm$  desvio padrão.



**Gráfico 3.** Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 após 24 horas de contacto com diferentes quantidades de resina R1, R2 e R3 determinado pelo ensaio de coloração violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.

Como controlo de células não expostas foram utilizadas células em contacto com 200  $\mu$ l de meio de cultura, sem extrato das resinas, correspondendo a 100% de viabilidade celular.

Por análise dos gráficos 2 e 3 podemos concluir que tanto no ensaio do MTT como no ensaio do violeta cristal as três resinas são citotóxicas quando em contacto com os fibroblastos 3T3, uma vez que a viabilidade celular é menor que 100% em todas as concentrações.

A resina R1 apresenta menor citotoxicidade, i.e. maior percentagem de viabilidade celular quando em contacto com as células durante 24 horas comparativamente com a resina R2 e R3. Por outro lado, a resina R3 apresenta maior citotoxicidade quando comparado com as resinas R1 e R2.

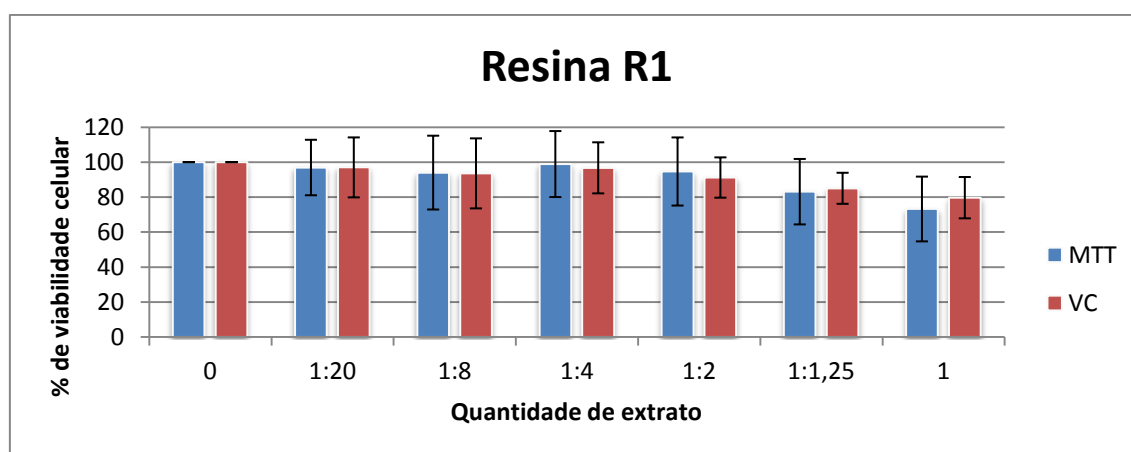
Foi realizado o teste ANOVA *one-way* com correção de Welch, com um nível de significância de  $p\text{-value} \leq 0,05$  para verificar a significância estatística dos valores médios das diluições para cada resina. Posteriormente, realizou-se o teste de comparação múltipla de *post-hoc* de Tamhane para se obter os subgrupos homogêneos,

ou seja, para analisar quais os valores de viabilidade celular que têm diferenças significativas quando se aumenta a quantidade de extrato em contacto com as células para cada resina (R1,R2 e R3).

### B.1. Resina R1

**Tabela 7.** Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R1 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão. O *p-value* corresponde ao nível de significância entre as várias quantidades de extrato. (a), (b) e (c) corresponde aos sub-grupos homogêneos.

Resina	Tipo de ensaio	Quantidade de extrato						<i>p-value</i>
		1:20	1:8	1:4	1:2	1:1,25	1	
R1	MTT	96,92 $\pm 15,87^{a,b}$	94,01 $\pm 21,11^{a,b}$	98,90 $\pm 18,87^a$	94,64 $\pm 19,48^{a,b}$	83,10 $\pm 18,72^{b,c}$	73,20 $\pm 18,52^c$	<0,001
	VC	96,99 $\pm 17,15^a$	93,57 $\pm 20,02^a$	96,73 $\pm 14,60^a$	91,19 $\pm 11,52^{a,b}$	85,03 $\pm 8,88^{a,b}$	79,67 $\pm 11,81^b$	<0,001



**Gráfico 4.** Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R1 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.

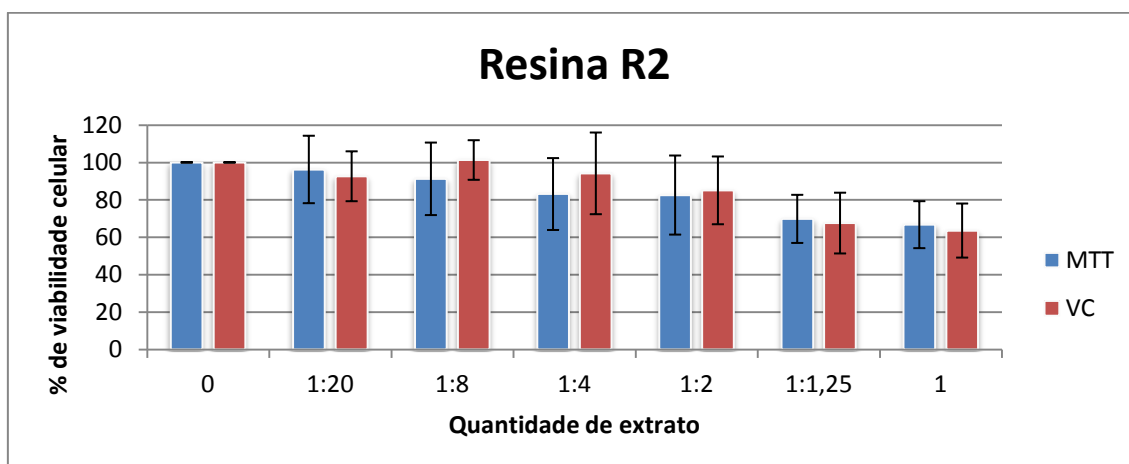
Como podemos observar na tabela 7 e no gráfico 4, com o aumento da quantidade de extrato adicionado da resina R1 há diminuição da viabilidade celular, exceto na diluição 1:4 que a viabilidade celular aumenta, não sendo este aumento estatisticamente diferente quando comparado com a diluição 1:8 e 1:2.

A diluição 1:20, comparativamente com as restantes diluições apresenta uma percentagem de viabilidade superior (MTT – 96,92% e VC – 96,99%), sendo a diluição 1 a que apresenta uma viabilidade menor (MTT – 73,20% e VC – 79,67%), o que confirma que o aumento da dose de extrato de resina aumenta a morte celular.

## B.2. Resina R2

**Tabela 8.** Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R2 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão. O *p-value* corresponde ao nível de significância entre as várias quantidades de extrato. (a), (b) e (c) corresponde aos sub-grupos homogêneos.

Resina	Tipo de ensaio	Quantidade de extrato						<i>p-value</i>
		1:20	1:8	1:4	1:2	1:1,25	1	
R2	MTT	96,22 $\pm 18,02^a$	91,22 $\pm 19,37^a$	83,09 $\pm 19,21^{a,b}$	82,54 $\pm 21,14^{a,b}$	69,81 $\pm 12,86^{b,c}$	66,72 $\pm 12,55^c$	<0,001
	VC	92,59 $\pm 13,33^{a,b}$	101,28 $\pm 10,59^a$	94,14 $\pm 21,83^{a,b}$	85,05 $\pm 18,11^b$	67,57 $\pm 16,24^c$	63,56 $\pm 14,45^c$	<0,001



**Gráfico 5.** Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R2 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.

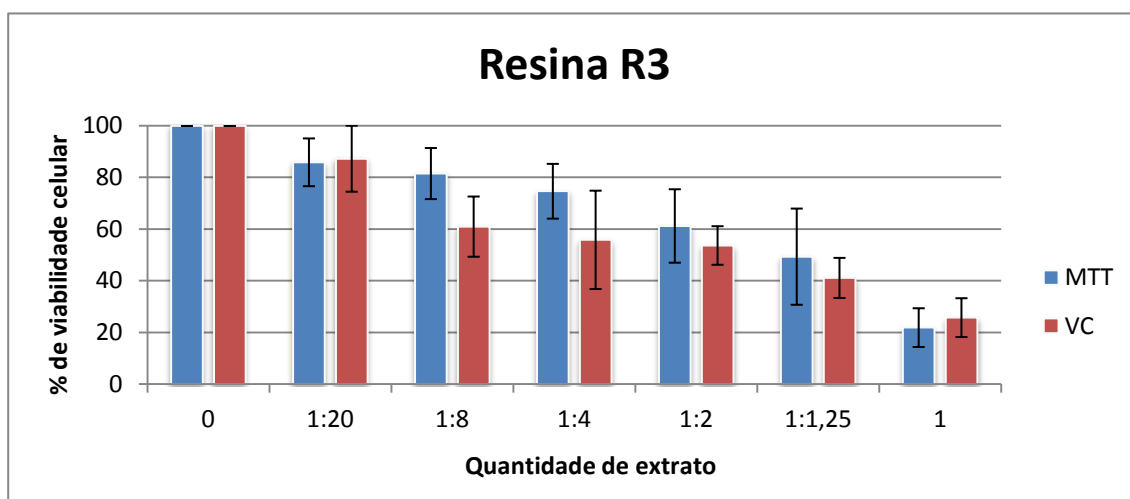
A resina R2 é citotóxica em todas as diluições como podemos verificar na tabela 8 e no gráfico 5.

O valor mais elevado de percentagem de viabilidade celular é encontrado na diluição 1:20 (MTT- 99,22% e VC – 92,59%) e o valor mais baixo na diluição 1 (MTT – 66,72% e VC – 63,56%).

### B.3. Resina R3

**Tabela 9.** Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R3 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão. O *p-value* corresponde ao nível de significância entre as várias quantidades de extrato. (a), (b), (c) e (e) corresponde aos sub-grupos homogéneos.

Resina	Tipo de ensaio	Quantidade de extrato						<i>p-value</i>
		1:20	1:8	1:4	1:2	1:1,25	1	
R3	MTT	85,84 $\pm 9,24^a$	81,48 $\pm 9,88^{a,b}$	74,64 $\pm 10,59^b$	61,20 $\pm 14,21^c$	49,33 $\pm 18,61^d$	21,89 $\pm 7,49^e$	<0,001
	VC	87,24 $\pm 12,77^a$	60,95 $\pm 11,65^b$	55,84 $\pm 19,02^b$	53,66 $\pm 7,46^b$	41,11 $\pm 7,75^c$	25,76 $\pm 7,50^d$	<0,001



**Gráfico 6.** Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com diferentes quantidades de extrato de resina R3 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.

Para a resina R3 podemos afirmar que o valor mais elevado de percentagem de viabilidade celular foi encontrado na diluição 1:20 (MTT- 85,84% e VC- 87,24%), em que apenas se adicionou 10  $\mu$ l de extrato e 190  $\mu$ l de meio de cultura e o valor menor de viabilidade celular foi na diluição 1 em que só se adicionou extrato da resina (MTT – 21,89% e VC – 25,76%), sendo estes valores substancialmente menores o que podemos afirmar que esta resina tem um grau de citotoxicidade muito elevado.

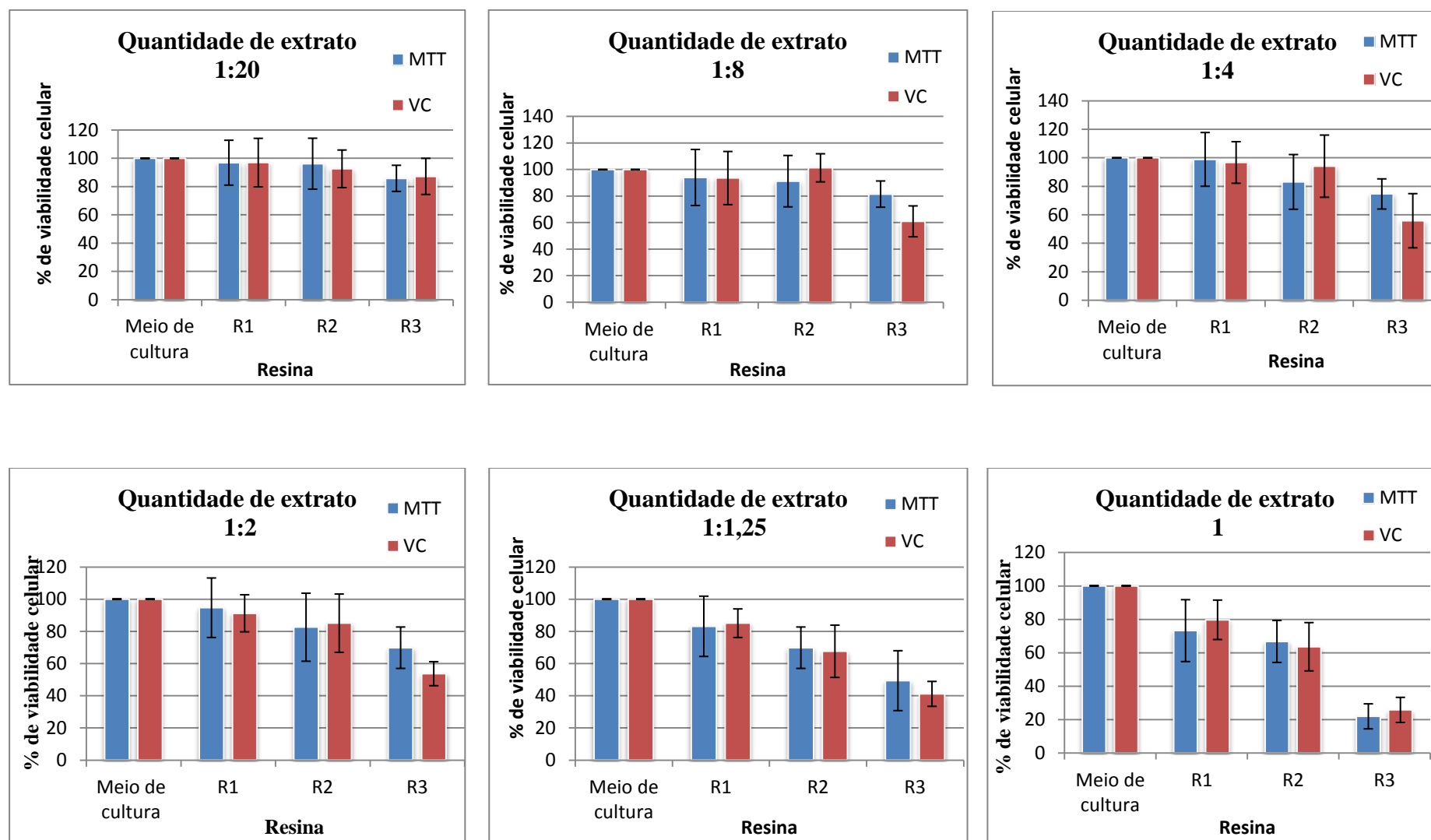
Os valores médios da percentagem de viabilidade celular são estatisticamente relevantes e há diferenças estatísticas na generalidade das diferentes diluições, como pode ser observado na tabela 9.



#### B.4. Comparação da percentagem de viabilidade celular das diferentes resinas quando adicionado a mesma quantidade de extrato

**Tabela 10.** Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com a mesma quantidade de extrato da resina R1, R2 e R3 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão. O *p-value* corresponde ao nível de significância entre as várias resinas. (a), (b) e (c) corresponde aos sub-grupos homogêneos

		Tipo de Resina			
Quantidade de extrato	Tipo de Ensaio	R1	R3	R2	<i>p-value</i>
1:20	MTT	96,92 $\pm 15,87^a$	96,22 $\pm 18,02^a$	85,84 $\pm 9,24^b$	<0,01
	VC	96,99 $\pm 17,15$	92,59 $\pm 13,3$	87,24 $\pm 12,77$	0,074
1:8	MTT	94,01 $\pm 21,11^a$	91,22 $\pm 19,37^{a,b}$	81,48 $\pm 9,88^b$	<0,05
	VC	93,57 $\pm 20,02^a$	101,28 $\pm 10,59^a$	60,95 $\pm 11,65^b$	<0,05
1:4	MTT	98,90 $\pm 18,87^a$	83,09 $\pm 19,21^b$	74,64 $\pm 10,59^b$	<0,01
	VC	96,73 $\pm 14,60^a$	94,14 $\pm 21,83^a$	55,84 $\pm 19,02^b$	<0,01
1:2	MTT	94,64 $\pm 18,48^a$	82,54 $\pm 21,14^a$	69,81 $\pm 12,86^b$	<0,001
	VC	91,19 $\pm 11,52^a$	85,05 $\pm 18,11^a$	53,66 $\pm 7,46^b$	<0,001
1:1,25	MTT	83,10 $\pm 18,72^a$	69,81 $\pm 12,86^b$	49,33 $\pm 18,61^c$	<0,001
	VC	85,03 $\pm 8,88^a$	67,57 $\pm 16,24^b$	41,11 $\pm 7,75^c$	<0,001
1	MTT	73,20 $\pm 18,52^a$	66,72 $\pm 12,55^a$	21,89 $\pm 7,49^b$	<0,001
	VC	79,67 $\pm 11,81^a$	63,56 $\pm 14,45^b$	25,76 $\pm 7,50^c$	<0,001



**Gráfico 7.** Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com a mesma quantidade de extratos da resina R1, R2 e R3 durante 24 horas referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.

Para verificarmos se havia diferenças significativas nas percentagens de viabilidade celular quando adicionado a mesma quantidade de extrato de cada resina às células foi realizado o teste ANOVA *one-way* com correlação de Welch para um nível de significância de 5% e posteriormente o teste *post-hoc* de Tamhane.

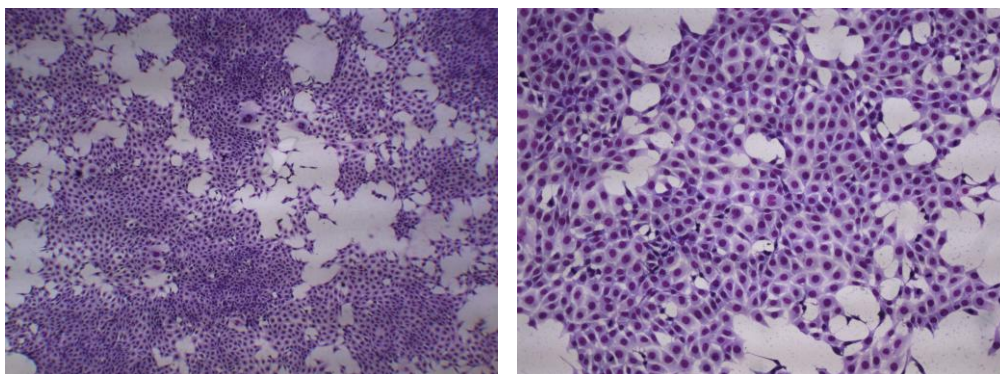
Pela análise da tabela 10, podemos constatar que há significado estatístico em todas as resinas quando adicionadas as diferentes quantidades de extratos, exceto na diluição 1:20 no ensaio do violeta cristal que o *p-value* = 0,074, querendo isto dizer que para esta quantidade de extrato das diferentes resinas não há diferenças estatisticamente relevantes na viabilidade celular.

A resina R3 comparativamente com a resina R1 e R2 apresenta diferenças estatísticas em todas as diluições exceto na diluição 1:20 no ensaio do violeta cristal e 1:8 do MTT, ou seja esta resina é mais citotóxica em todas as diluições comparativamente com a R1 e R2.

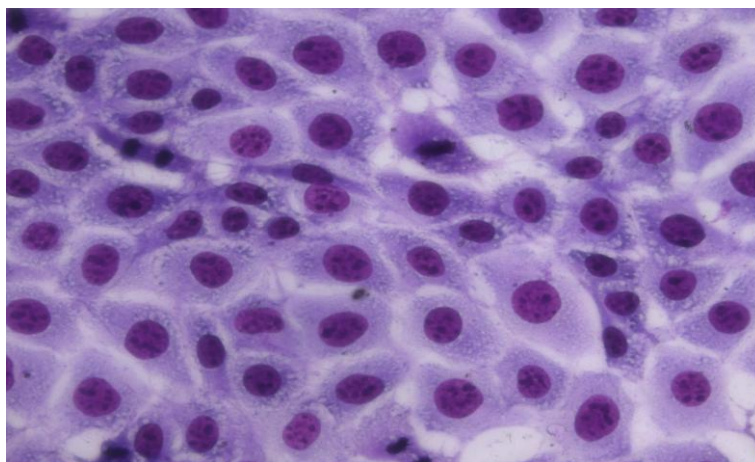
Por outro lado, a diferença entre a resina R1 e R2 não se verifica em todas as diluições, apenas nas diluições 1:4 e 1:1,25 no ensaio do MTT e 1:1,25 e 1 no VC. Em todas as outras diluições a mesma quantidade de resina R1 e R2 adicionada às células 3T3 provocam valores de viabilidade celular estatisticamente iguais, querendo isto dizer que estas as duas resinas apresentam um comportamento idêntico quando em contacto com as células.

#### **B - I. Coloração de Giemsa das células 3T3 em contacto com o extrato da resina R3 após 24 horas de libertação**

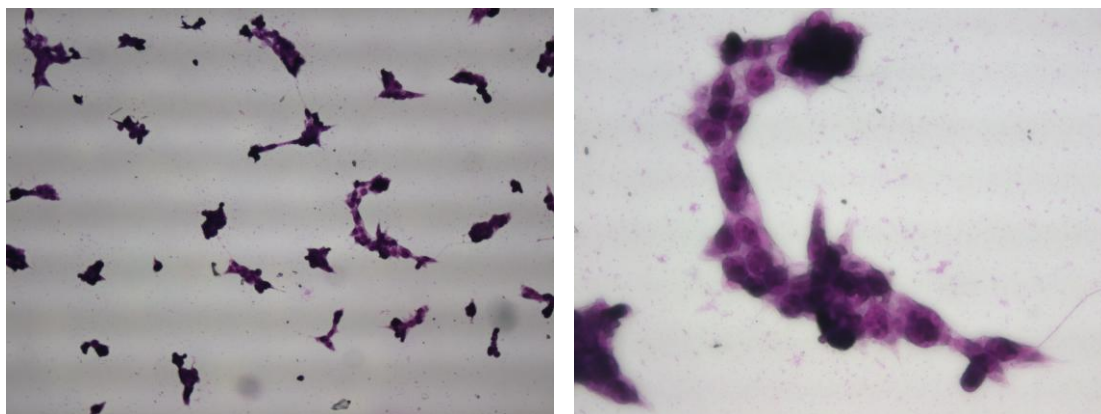
Neste ensaio foi realizada a coloração de Giemsa das células 3T3 após terem estado em contacto com o extrato da resina R3 por 24 horas e das células 3T3 apenas em contacto com meio de cultura.



**Figura 13.** Imagens ao MO (objetiva 10x e 20x) do resultado da cultura de células após 24 horas de contacto com o meio de cultura coradas pela coloração de Giemsa.



**Figura 14.** Imagens ao MO (objetiva 40x) do resultado da cultura de células após 24 horas de contacto com o meio de cultura coradas pela coloração de Giemsa.



**Figura 15.** Imagens ao MO (objetiva 20x e 40x) do resultado da cultura de células após 24 horas de contacto com o extrato da resina R3 coradas pela coloração de Giemsa.

Na figura 13 e 14 observa-se uma confluência de cerca de 80% das células fibroblásticas 3T3. As células apresentam uma morfologia fibroblástica normal, tamanho normal com forma fusiforme, núcleo central e a ocorrerem mitoses.

Por outro lado, na figura 15 que corresponde às células que estiveram em contacto com o extrato da resina R3, observa-se uma confluência de cerca de 20%, células isoladas e sem morfologia típica fibroblástica, tamanho pequeno e difícil de ver o detalhe interno.

### **C. ENSAIO III: Extrato das resinas durante 48 horas, 72 horas e 5 dias de libertação**

No ensaio III, os discos de resina foram pré-incubados 48 horas, 72 horas e 5 dias em meio de cultura antes de estarem em contacto com as células 3T3.

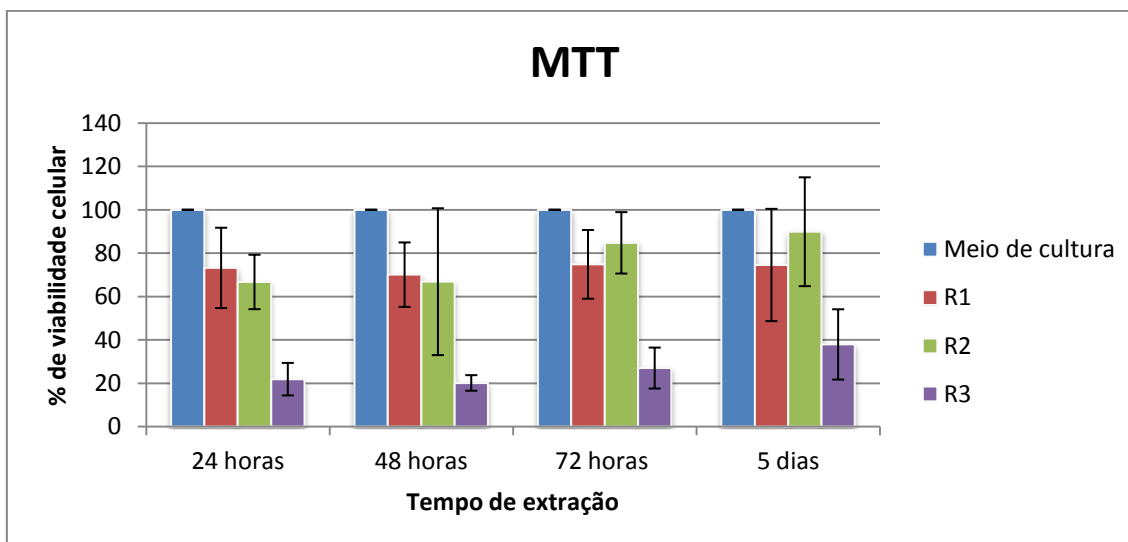
Após o tempo de pré-incubação das resinas os extratos libertados pelas resinas foram filtrados e colocados em contacto com as células. Após 24 horas de contacto foi realizado o ensaio do MTT e violeta cristal e lidas as absorvâncias por espectrofotometria num comprimento de onda de 595 nm.

Como controlo foi utilizado as células em contacto com meio de cultura durante 24 horas, correspondendo a 100 % de viabilidade celular.

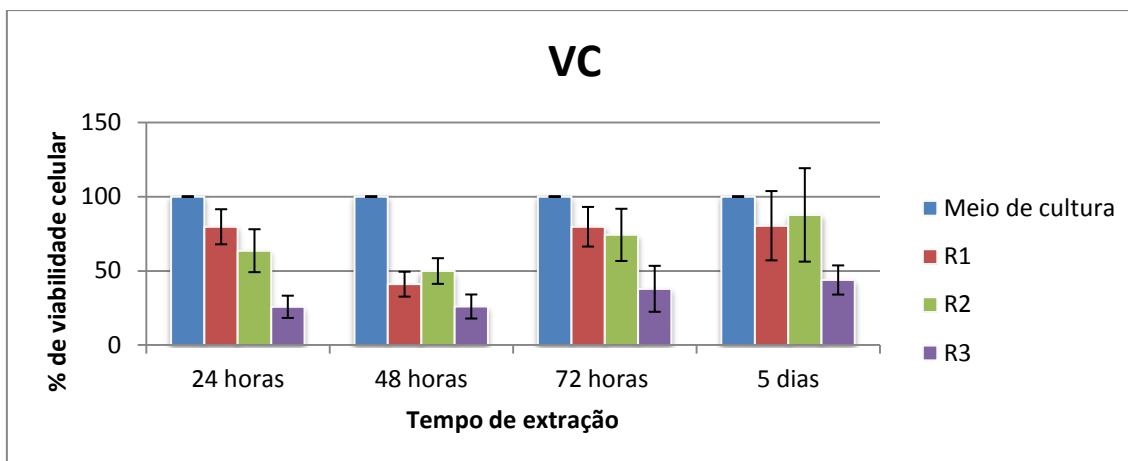
Os valores das médias de percentagem de viabilidade celular referentes a 24 horas de incubação foram utilizados os do ensaio II da diluição 1 das três resinas, para se comparar com os restantes períodos de pré-incubação.

**Tabela 11.** Valores médios de percentagem de viabilidade celular das células 3T3 após contacto com os extratos libertados durante 24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias da resina R1, R2 e R3 referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.

Resina	Tipo de Ensaio	Tempo de extração			
		24 Horas	48 Horas	72 Horas	5 Dias
R1	MTT	73,20 $\pm$ 18,52	70,09 $\pm$ 14,86	74,83 $\pm$ 15,85	74,54 $\pm$ 25,89
	VC	79,67 $\pm$ 11,81	41,01 $\pm$ 8,39	79,69 $\pm$ 13,34	80,38 $\pm$ 23,34
R2	MTT	66,72 $\pm$ 12,55	66,85 $\pm$ 33,86	84,76 $\pm$ 14,16	89,88 $\pm$ 25,09
	VC	63,56 $\pm$ 14,45	49,86 $\pm$ 8,64	74,21 $\pm$ 17,58	87,66 $\pm$ 31,48
R3	MTT	21,89 $\pm$ 7,49	20,15 $\pm$ 3,59	27,02 $\pm$ 9,44	37,91 $\pm$ 16,21
	VC	25,76 $\pm$ 7,50	25,97 $\pm$ 8,10	37,89 $\pm$ 15,47	43,83 $\pm$ 9,83



**Gráfico 8.** Percentagens de viabilidade celular das células 3T3 após contacto com os extratos libertados durante a pré-incubação das resinas R1, R2 e R3 por 24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias referentes ao ensaio do MTT  $\pm$  desvio padrão.



**Gráfico 9.** Percentagens de viabilidade celular das células 3T3 após contacto com os extratos libertados durante a pré-incubação das resinas R1, R2 e R3 por 24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias referentes ao ensaio do violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.

Pela análise do gráfico 8 e 9 e da tabela 11 podemos constatar que para todos os períodos de pré-incubação das três resinas a viabilidade celular é menor que 100%, i.e. as resinas R1, R2 e R3 com diferentes períodos de libertação dos seus compostos são citotóxicas para os fibroblastos 3T3.

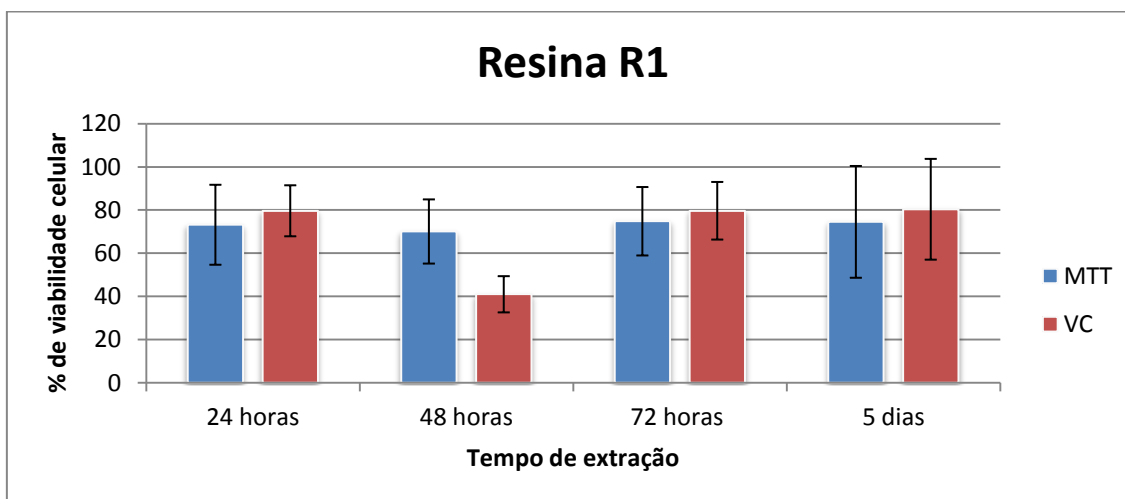
A resina R3 é mais citotóxica que a resina R1 e R2 em todos os períodos de pré-incubação. Por outro lado, a resina R1 nos períodos de incubação de 24 horas e 48 horas apresenta uma citotoxicidade menor que a resina R2, mas para os períodos de libertação dos compostos de 72 horas e 5 dias torna-se mais citotóxica que a resina R2, no ensaio do MTT.

Para o ensaio III foi realizado o teste ANOVA *one-way* com correção de Welch, com um nível de significância de 5%, para verificar se as médias obtidas tinham significado estatístico. Posteriormente realizou-se o teste de *post-hoc* de comparação múltipla com o objetivo de verificar se havia diferenças significativas entre os diferentes períodos de pré-incubação da mesma resina, e por outro lado se havia diferenças entre as resinas quando estas foram incubadas pelo mesmo período de incubação.

### C.1. Resina R1

**Tabela 12.** Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com os extratos da resina R1 com diferentes períodos de pré-incubação (24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias) referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão. O *p-value* corresponde ao nível de significância entre os vários períodos de pré-incubação.

Resina	Tipo de Ensaio	Tempo de extração				<i>p-value</i>
		24 Horas	48 Horas	72 Horas	5 Dias	
R1	MTT	73,20 $\pm$ 18,52	70,09 $\pm$ 14,86	74,83 $\pm$ 15,85	74,54 $\pm$ 25,89	0,736
	VC	79,67 $\pm$ 11,81 <sup>a</sup>	41,01 $\pm$ 8,39 <sup>b</sup>	79,69 $\pm$ 13,34 <sup>a</sup>	80,38 $\pm$ 23,34 <sup>a</sup>	<0,001



**Gráfico 10.** Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com extratos de resina R1 com diferentes períodos de pré-incubação referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.



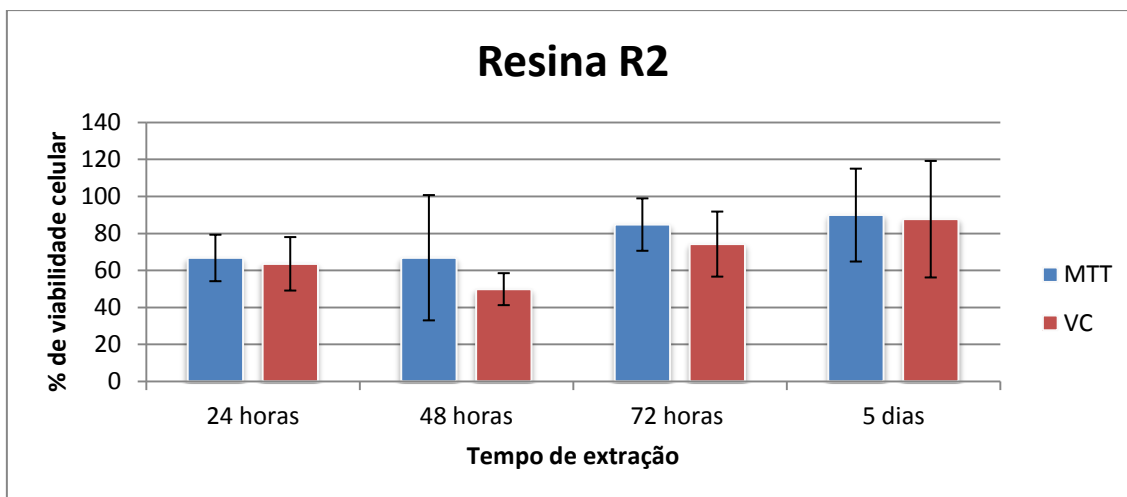
Pela análise da tabela 12 e gráfico 10 podemos constatar que a citotoxicidade da resina R1 com os diferentes períodos de pré-incubação não é estatisticamente significativa ( $p\text{-value} = 0,736$ ) no ensaio do MTT. Por outro lado, no ensaio do violeta cristal a diferença de citotoxicidade é estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), visto que às 48 horas a viabilidade celular decresce acentuadamente.

A menor percentagem de viabilidade celular é observada quando a resina é pré-incubada durante 48 horas (MTT- 70,09% e VC – 41,01%) e a maior percentagem de viabilidade celular aos 5 dias de pré-incubação.

## C.2. Resina R2

**Tabela 13.** Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com os extratos da resina R2 com diferentes períodos de pré-incubação (24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias) referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão. O  $p\text{-value}$  corresponde ao nível de significância entre os vários períodos de pré-incubação. (a) e (b) correspondem aos grupos homogêneos.

Resina	Tipo de Ensaio	Tempo de extração				$p\text{-value}$
		24 Horas	48 Horas	72 Horas	5 Dias	
R2	MTT	66,72 $\pm$ 12,55 <sup>a</sup>	66,85 $\pm$ 33,86 <sup>a</sup>	84,76 $\pm$ 14,16 <sup>b</sup>	89,88 $\pm$ 25,09 <sup>b</sup>	<0,10
	VC	63,56 $\pm$ 14,45 <sup>a,b</sup>	49,86 $\pm$ 8,64 <sup>a</sup>	74,21 $\pm$ 17,58 <sup>b,c</sup>	87,66 $\pm$ 31,48 <sup>c</sup>	<0,001



**Gráfico 11.** Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com extratos de resina R2 com diferentes períodos de pré-incubação referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.

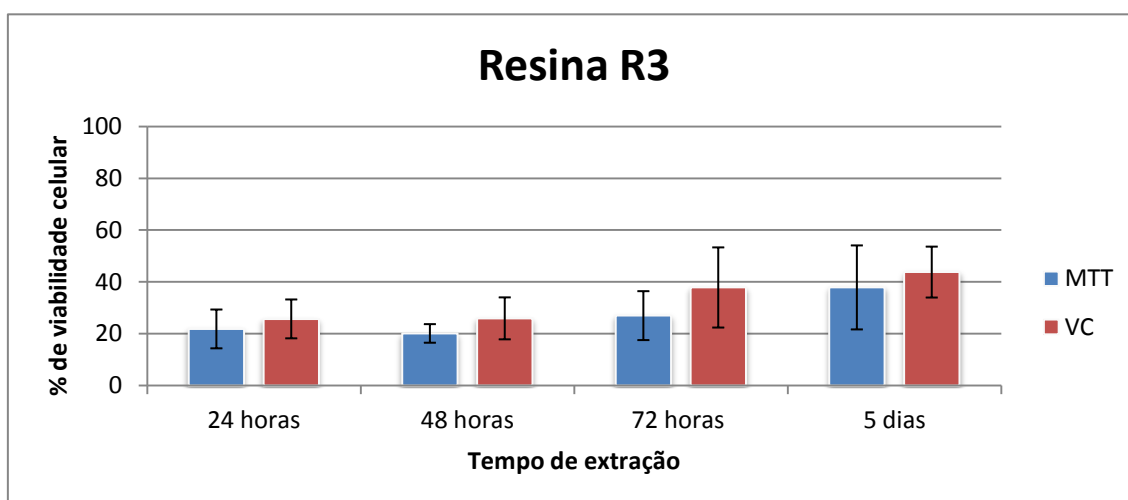
Os diferentes períodos de pré-incubação da resina R2 provocam diferenças na citotoxicidade. Na generalidade, quanto maior o período de pré-incubação menor a citotoxicidade, sendo estas diferenças mais significativas quando a resina é pré-incubada durante 72 horas e 5 dias comparativamente com 24 horas e 48 horas.

O maior valor de viabilidade celular foi observado aos 5 dias de incubação (MTT – 89,88% e VC – 87,66%).

### C.3. Resina R3

**Tabela 14.** Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com os extratos da resina R3 com diferentes períodos de pré-incubação (24 horas, 48 horas, 72 horas e 5 dias) referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão. O *p-value* corresponde ao nível de significância entre os vários períodos de pré-incubação. (a) e (b) correspondem aos grupos homogêneos.

Resina	Tipo de Ensaio	Tempo de extração				<i>p-value</i>
		24 Horas	48 Horas	72 Horas	5 Dias	
R3	MTT	21,89 $\pm$ 7,49 <sup>a</sup>	20,15 $\pm$ 3,59 <sup>a</sup>	27,02 $\pm$ 9,44 <sup>a</sup>	37,91 $\pm$ 16,21 <sup>b</sup>	<0,001
	VC	25,76 $\pm$ 7,50 <sup>a</sup>	25,97 $\pm$ 8,10 <sup>a</sup>	37,89 $\pm$ 15,47 <sup>b</sup>	43,83 $\pm$ 9,83 <sup>b</sup>	<0,001



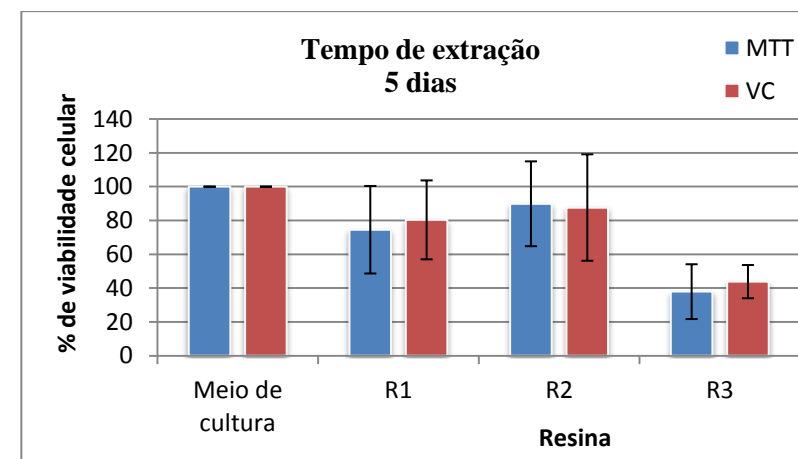
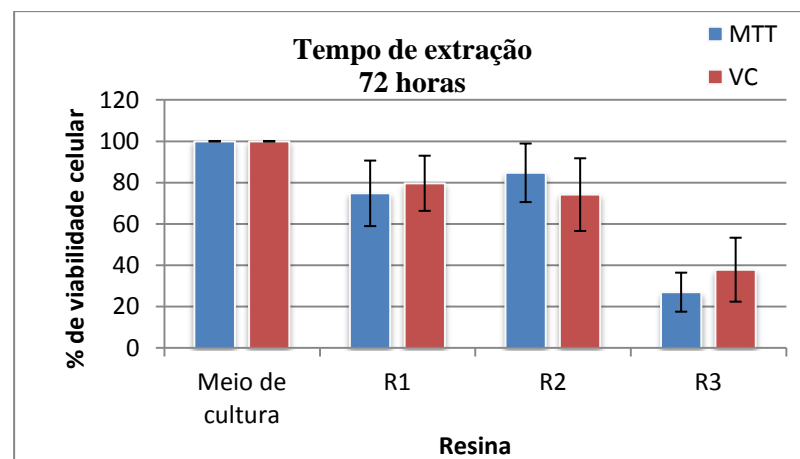
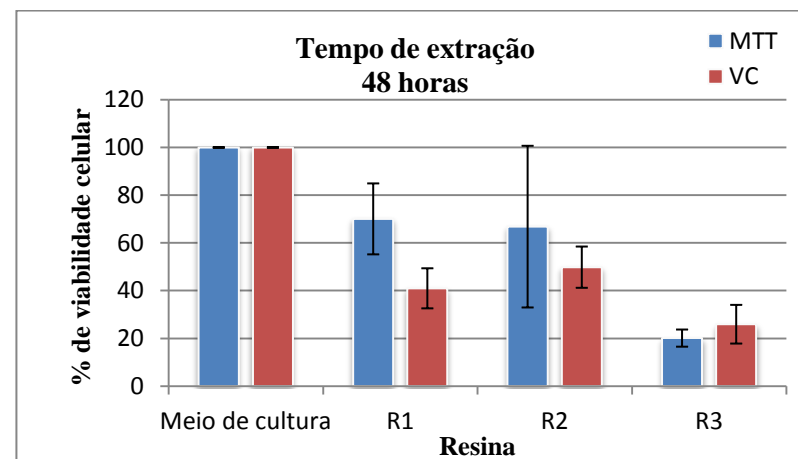
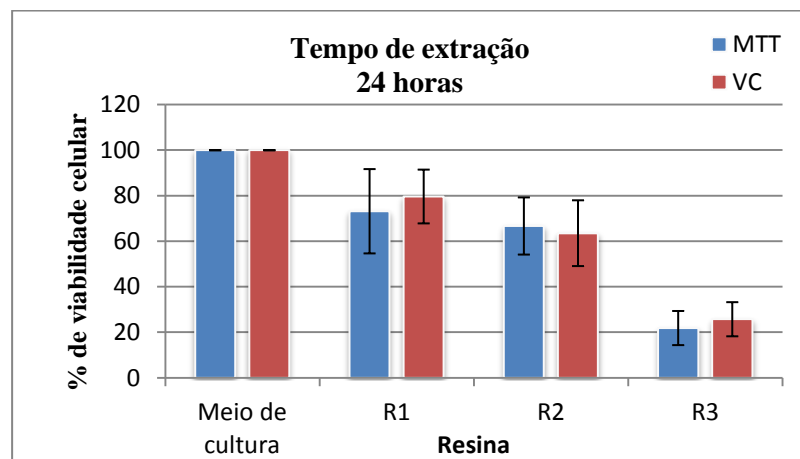
**Gráfico 12.** Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com extratos de resina R3 com diferentes períodos de pré-incubação referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.

Na resina R3, por observação do gráfico 12 e tabela 14, podemos concluir que a percentagem de viabilidade celular é maior quando o período de pré-incubação é de 5 dias comparativamente com os outros períodos de pré-incubação, ou seja, quanto mais tempo a resina R3 está em contacto com o meio de cultura a libertar os seus compostos a citotoxicidade é menor.

#### C.4. Comparação da percentagem de viabilidade celular das diferentes resinas pré-incubadas pelo mesmo período de tempo

**Tabela 15.** Médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com os extratos das diferentes resinas com o mesmo tempo de pré-incubação referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão. O *p-value* corresponde ao nível de significância entre as várias resinas. (a), (b) e (c) corresponde aos sub-grupos homogêneos.

Tempo	Tipo de Ensaio	Tipo de Resina			<i>p-value</i>
		R1	R2	R3	
24 Horas	MTT	73,20 $\pm$ 18,52 <sup>a</sup>	66,72 $\pm$ 12,55 <sup>b</sup>	21,89 $\pm$ 7,49 <sup>c</sup>	<0,001
	VC	79,67 $\pm$ 11,81 <sup>a</sup>	63,56 $\pm$ 14,45 <sup>b</sup>	25,76 $\pm$ 7,50 <sup>c</sup>	<0,001
48 Horas	MTT	70,09 $\pm$ 14,86 <sup>a</sup>	66,85 $\pm$ 33,86 <sup>a</sup>	20,15 $\pm$ 3,59 <sup>b</sup>	<0,001
	VC	41,01 $\pm$ 8,39 <sup>a</sup>	49,86 $\pm$ 8,64 <sup>b</sup>	25,97 $\pm$ 8,10 <sup>c</sup>	<0,001
72 Horas	MTT	74,83 $\pm$ 15,85 <sup>a</sup>	84,76 $\pm$ 14,16 <sup>b</sup>	27,02 $\pm$ 9,44 <sup>c</sup>	<0,001
	VC	79,69 $\pm$ 13,34 <sup>a</sup>	74,21 $\pm$ 17,58 <sup>a</sup>	37,89 $\pm$ 15,47 <sup>b</sup>	<0,001
5 Dias	MTT	74,54 $\pm$ 25,89 <sup>a</sup>	89,88 $\pm$ 25,09 <sup>a</sup>	37,91 $\pm$ 16,21 <sup>b</sup>	<0,001
	VC	80,38 $\pm$ 23,34 <sup>a</sup>	87,66 $\pm$ 31,48 <sup>a</sup>	43,83 $\pm$ 9,83 <sup>b</sup>	<0,001



**Gráfico 13.** Variância das médias das percentagens de viabilidade celular das células 3T3 quando em contacto com os extratos da resina R1, R2 e R3 pré-incubados pelo mesmo período de tempo referente ao ensaio de redução do MTT e violeta cristal  $\pm$  desvio padrão.

Ao observar a tabela 15 podemos constatar que há diferenças significativas na percentagem de viabilidade celular quando as resinas são incubadas pelo mesmo período de tempo.

As diferenças mais significativas são entre a resina R3 e a resina R1 e R2, a citotoxicidade da resina R3 é mais elevada em todos os períodos de incubação comparativamente com a resina R1 e R2.

A menor percentagem de viabilidade celular é encontrada na resina R3, quando esta é incubada durante 48 horas para o ensaio do MTT (20,15%) e para o ensaio do violeta cristal nas 24 horas de incubação, embora o resultado obtido às 24 horas comparativamente às 48 horas neste ensaio seja insignificante (25,76% e 25,97% respetivamente).

A maior percentagem de viabilidade celular é observada na resina R2 quando esta é libertada por 5 dias (MTT – 89,88% e VC – 87,66%).

A resina R1 às 24 horas e 48 horas de incubação apresenta maior viabilidade celular comparativamente com a resina R2, mas quando as resinas são incubadas por 72 horas e 5 dias a resina R2 apresenta maior viabilidade celular.

Na generalidade, nas 48 horas de incubação das três resinas a viabilidade celular é menor comparativamente com os outros períodos de incubação, querendo isto dizer que quando as resinas estão em contacto com o meio de cultura durante 48 horas o extrato é mais citotóxico do que os extratos de libertação por 24 horas, 72 horas e 5 dias.

Mas por outro lado, há diferenças significativas quando as resinas são incubadas por um período de tempo maior, havendo diminuição do potencial de toxicidade.

#### IV. DISCUSSÃO

Os materiais dentários onde se incluem as resinas utilizadas nas coroas provisórias devem ser biocompatíveis para minimizar os efeitos adversos nos tecidos periodontais induzidos pelo contacto direto, assim foram desenvolvidos vários métodos para avaliar e garantir a compatibilidade dos materiais antes de serem utilizados clinicamente. Os resultados obtidos nos testes não dependem apenas do material em estudo mas também do tipo de método utilizado (Schmalz, G., 2009).

Dentro dos teste de biocompatibilidade *in vitro* encontram-se os testes de citotoxicidade que utilizam culturas de células para determinar o comportamento biológico dos materiais dentários e/ou dos seu componentes (Jorge, Giampaolo, & Pavarina, 2004).

Os testes de citotoxicidade têm como vantagens permitirem uma rápida avaliação, protocolos padronizados, produzem dados quantitativos e comparáveis e devido à sua sensibilidade permitem também que os materiais tóxicos sejam descartados previamente aos testes *in vivo* em animais ou humanos (Vital, Silva, Souza, Ferreira, & Vital, 2008).

No presente estudo foram testados os efeitos citotóxicos de três resinas: Protemp 4<sup>TM</sup> - 3 M ESPE, Structur 3<sup>®</sup> - VOCO e Tab 2000<sup>®</sup> - KERR usadas na confecção de restaurações provisórias em prótese fixa quando em contacto com fibroblastos gengivais tendo sido utilizados diversos ensaios *in vitro* como o ensaio de redução do MTT e do violeta cristal.

O ensaio do MTT e violeta cristal são ensaios colorimétricos que permitem quantificar o número de células viáveis presentes nas culturas celulares após incubação com os compostos citotóxicos (Ishiyama, et al., 1996).

As células utilizadas neste ensaio foram os fibroblastos 3T3 de murganho, que são consideradas células de referência para este tipo de testes uma vez que pertencem a uma linha celular permanente que são fáceis de ampliar e o seu comportamento é conhecido, consistente e constante (Schmalz, G., 2009).

Após revisão bibliográfica concluiu-se que não existem estudos publicados que testem a citotoxicidade das resinas utilizadas no presente trabalho, mas apenas resinas de outras marcas que têm constituição química semelhantes a estas ou os compostos isoladamente.

Com o objetivo de verificar qual o número de células apropriado para o nosso estudo, foi feito um ensaio de otimização do número de células, visto que as células dos poços controle devem estar numa confluência de cerca de 80% nas placas de 96 poços no dia em que se adiciona o MTT para que o valor de absorvância lido esteja dentro da lei de Lambert-beer e os valores de absorvância dos controles sejam constantes. O número de células escolhido para os ensaios subsequentes foi de  $4 \times 10^3$  células por poço das placas de 96 poços.

Foram realizados vários ensaios, otimizando as condições experimentais, até se obter um protocolo que nos levasse a resultados consistentes, para isso optámos pela realização de dois testes de mensuração de citotoxicidade como o ensaio de redução do MTT e o ensaio do violeta cristal para confirmar os resultados obtidos no primeiro. Após o período de incubação com os compostos, as culturas celulares foram submetidas então a esses dois ensaios para obtenção das percentagens de viabilidade celular. Este protocolo consistiu na incubação das células 3T3 com diferentes diluições dos extratos das resinas durante 24 horas, em que estas diluições eram obtidas pela adição de meio de cultura aos extratos das resinas. Após se ter verificado que as resinas eram tóxicas para os fibroblastos gengivais, quisemos testar se a libertação dos extratos para além das 24 horas provocavam respostas diferentes nos fibroblastos.

Os métodos por nós realizados foram baseados em estudos efetuados anteriormente bem como pelos resultados que fomos obtendo ao longo do nosso estudo, assim sendo nenhum protocolo publicado foi por nós seguido na íntegra tendo sido adaptado aos nossos objetivos e questões que foram colocadas ao longo do processo experimental. Por esta razão não é possível comparar os valores nominais obtidos neste estudo com valores obtidos noutros estudos.

Após análise estatística, verificou-se que as três resinas utilizadas neste estudo são citotóxicas para os fibroblastos gengivais. A resina que provocou maior morte celular foi a resina composta à base de dimetacrilato de uretano (Structur 3<sup>®</sup>), e a que provocou



menor morte celular foi a resina composta de bis-acrílico (Protemp 4<sup>TM</sup>). Verificou-se também que todas as resinas têm um efeito dose-dependente, ou seja, o aumento da concentração das resinas em contacto com os fibroblastos, leva a um aumento da sua taxa de morte celular.

A norma ISO 10993-5:2009 (2009) classifica os graus de citotoxicidade dos materiais como não-citotóxicos quando a viabilidade celular é maior que 75%, ligeiramente citotóxico quando é entre 50 a 70%, moderadamente citotóxico entre 25 e 50% e altamente citotóxico quando é menor que 25%. Segundo os resultados obtidos neste estudo as resinas à base de bis-acrílico (Protemp 4<sup>TM</sup>) e polimetil metacrilato (Tab2000<sup>®</sup>) são classificadas como ligeiramente citotóxicas uma vez que a percentagem de viabilidade celular é respetivamente 73,20% e 66,72% e a resina à base de dimetacrilato de uretano (Structur 3<sup>®</sup>) apresenta uma viabilidade celular de 21,89% sendo classificada como altamente citotóxica.

A toxicidade dos componentes dos materiais não foi avaliada separadamente, os materiais testados estavam nas formas de produtos finais independentemente da diversidade de ingredientes utilizados na sua composição.

Alguns estudos têm sido realizados para pesquisar os efeitos citotóxicos dos acrilatos e metacrilatos das resinas, demonstrando uma relação entre a sua composição química e o grau de citotoxicidade. A constituição química das resinas por norma não é totalmente conhecida, pois há monómeros desconhecidos que são protegidos pelas patentes das marcas o que dificulta uma identificação dos componentes que provocam a citotoxicidade (Ulker, et al., 2009).

Estudos realizados por Yoshii (2007) e Gauthier *et al* (2007) demonstram que os acrilatos onde se incluem os monómeros de dimetacrilato de uretano e o Bis-GMA são mais tóxicos que os metacrilatos como o polimetil metacrilato, que segundo os nossos resultados podemos chegar à mesma conclusão visto que a resina que provou ser mais tóxica é a resina composta à base de dimetacrilato de uretano, independentemente da concentração.

O grau de conversão dos monómeros a polímeros é influenciado pelo tipo de monómero, temperatura de polimerização, exposição ao oxigénio, alguns iniciadores e partículas de carga que segundo Kim & Watts (2004) depois da polimerização, os

monómeros não polimerizados das resinas compostas bis-acrílico podem afectar as propriedades físicas e mecânicas bem como a biocompatibilidade, podendo causar efeitos citotóxicos na polpa e na mucosa oral e consequentemente inflamação ou recessão gengival.

Segundo, Chaves , Machado, Carlos, Giampaolo, Pavarina, & Vergani (2010) os monómeros não polimerizados das resinas influenciam a biocompatibilidade destas, podendo ser responsáveis por irritação química local, hipersensibilidade, sinais de inflamação da mucosa, vesículas e ulceração.

Labban *et al* (2008) demonstrou que os materiais à base de metil metacrilato apresentam menor toxicidade após reação de polimerização comparativamente com a forma de monómeros sem serem polimerizados e a pré incubação de resinas de PMMA com meio de cultura contendo soro segundo, Gough & Downes (2001) também diminui a citotoxicidade. No nosso estudo foram utilizadas as resinas após reação de polimerização, o que pode explicar o baixo grau de citotoxicidade da resina Tab 2000® comparativamente com os resultados obtidos em estudos anteriores com os monómeros na forma pura.

É de salientar que estas resinas quando são utilizadas pelo método direto ou para rebasamento das coroas provisórias contactam diretamente com os tecidos gengivais e a reação de polimerização ocorre em contacto com estes tecidos podendo provocar inflamação ou recessão gengival.

Segundo, Goldberg (2008) os mecanismos de citotoxicidade estão relacionados em primeiro lugar com a libertação a curto prazo de monómeros livres que ocorrem durante a conversão de monómero-polímero e em segundo lugar, pela libertação a longo prazo de substâncias lixiviáveis provocadas pela degradação ao longo do tempo do material. Este autor defende que a citotoxicidade das resinas é dose-dependente, tal como a citotoxicidade vai diminuindo ao longo do tempo em que nos períodos logo após a polimerização há libertação de monómeros não ligados e alteram processos metabólicos das células.

Schedle, *et al.* em 1998 realizou um estudo em que testou a citotoxicidade de resinas e demonstrou que a toxicidade era máxima imediatamente após a polimerização e os seus efeitos eram reduzidos quando as resinas eram pré-incubadas por um período de 1, 2 ,7

dias e 6 semanas. Moharamzadeh, Brook, & Noort em 2009, também realizaram um estudo em que usaram os extratos de resinas compostas e resinas de metacrilato com diferentes períodos de pré-incubação e concluíram que a toxicidade também diminui.

Nestes trabalho também se comprovou que os diferentes períodos de pré incubação de 24 horas, 72 horas e 5 dias das resinas provocam aumento na viabilidade celular, exceto às 48 horas que há diminuição da viabilidade celular comparativamente com as 24 horas.

Segundo, Gociu, *et al.*(2013) quando as células utilizadas nos testes de citotoxicidade estão em contacto com materiais não tóxico o crescimento é normal, proliferando ao longo do tempo e não há morte celular, enquanto que se os materiais forem citotóxicos como é o caso das resinas utilizadas para a confecção de coroas provisórias as células param o crescimento, exibem fenómenos de alterações bioquímicas e moleculares, o que é traduzido pela diminuição da viabilidade celular.

A citotoxicidade das resinas está relacionada com alterações na estrutura básica das células, como a integridade da membrana e funções celulares como atividade enzimática e a síntese de macromoléculas (Gautam, et al., 2012).

Várias hipóteses têm sido colocadas para tentar explicar o que provoca a diminuição da viabilidade celular quando as células são colocadas em contacto com o dimetacrilato de uretano, segundo um estudo realizado por Nassiri *et al* (1994) a concentração destes compostos alteram o ciclo celular funcionando como citostático ou citotóxico e que doses mais baixas de concentração produzem perturbações menores no ciclo celular e são apenas citostático.

Por outro lado, Gauthier, Simard, Zhang, & Zhu, (2007) afirma que a diminuição da viabilidade celular está relacionada com fenómenos de necrose celular. Pela análise microscópica das células, quando em contacto com a resina composta à base de dimetacrilato de uretano podemos concluir que esta resina tem um grande grau de citotoxicidade, alterando a estrutura e morfologia das células.

As restaurações provisórias são um elemento de grande importância no tratamento restaurador fixo, há requisitos que devem ser cumpridos para ser possível alcançar uma

restauração definitiva satisfatória. Cada vez mais os pacientes são exigentes com a estética assim, são desenvolvidos novos materiais com propriedades melhores.

A estética da reabilitação fica comprometida se os tecidos gengivais circundantes não estiverem saudáveis, se houver inflamação ou recessão gengival, como tal os materiais utilizados durante esta fase não devem provocar reações adversas nos tecidos.

Estudos futuros devem ser desenvolvidos de forma a avaliar quais os constituintes químicos que se encontram nos extratos das resinas e avaliar qual o fenómeno celular que ocorre para diminuição da viabilidade celular quando em contacto com as resinas. Bem como, estudos citológicos esfoliativos em doentes portadores de coroas provisórias e inclusive seguir para o passo seguinte onde se incluem os estudos em cobaias.

## V. CONCLUSÃO

Perante os diversos resultados obtidos ao longo do presente estudo e tendo em conta as limitações associadas a este podemos aceitar a hipótese alternativa: há diferenças nas reações de citotoxicidade dos fibroblastos da linha celular 3T3 de murganho quando em contacto com as resinas bis-acrílico (Protemp 4<sup>TM</sup>), resina à base de dimetacrilato de uretano (Structur 3<sup>®</sup>) e resina de PMMA, resina acrílica autopolimerizável de polimetil metacrilato (Tab 2000<sup>®</sup>).

- Os fibroblastos da linha celular 3T3 de murganho são sensíveis às resinas testadas em todas as concentrações, sugerindo os resultados a seguinte ordem de citotoxicidade: Protemp 4<sup>TM</sup> < Tab 2000<sup>®</sup> < Structur 3<sup>®</sup>;
- As três resinas apresentam um efeito dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração de resina em contacto com as células maior o seu poder citotóxico;
- A resina Structur 3<sup>®</sup> (resina composta de UDMA) é a resina mais citotóxica independentemente da sua concentração, provocando alterações na morfologia das células 3T3;
- Diferentes tempos de pré-incubação das resinas provocam diferenças na citotoxicidade;
- Um maior tempo de pré-incubação das resinas diminui o poder de citotoxicidade destas;
- As três resinas com um período de pré-incubação de 72 horas provocam uma taxa de morte celular menor que as resinas pré-incubadas durante 24 horas.

Devem ser realizados mais estudos de forma a avaliar o comportamento dos tecidos em contacto com estes materiais, bem como avaliar os componentes das resinas que provocam a citotoxicidade isoladamente.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- 3M. (2014). Obtido em 10 de Janeiro de 2014, de <http://www.3m.com/>
- Anusavice, K. J. (2012). Biocompatibility. In K. J. Anusavice, C. Shen, & H. R. Rawls, *Phillips Science of Dental Materials* (12 ed., pp. 111-147). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- ATCC. (2014). Obtido em 10 de Maio de 2014, de <http://www.lgcstandards-atcc.org/>
- Ayuso-Montero, R., Martinez-Gomis, J., Lujan-Climent, M., Salsench, J., & Peraire, M. (2009). Influence of matrix type on surface roughness of three resins for provisional crowns and fixed partial dentures. *Journal of Prosthodontics*, 18, 141-144.
- Balkenhol, M., Ferger, P., Mautner, M. C., & Wöstmann, B. (2007). Provisional crown and fixed partial denture materials: Mechanical properties and degree of conversion. *Dental Materials*, 23, 1574-1583.
- Balkenhol, M., Köhler, H., Orbach, K., & Wöstmann, B. (2009). Fracture toughness of cross-linked and non-cross-linked temporary crown and fixed partial denture materials. *Dental Materials*, 25, 917-928.
- Basprix. (2014). [www.basprix.com.br/home/](http://www.basprix.com.br/home/). Obtido em 12 de Agosto de 2014
- BMM 5777 – *Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia*. (s.d.). Obtido em 29 de Maio de 2014, de <http://www.ufrgs.br/>
- Borzangy, S., Labban, N., & Windsor, J. (2013). Effects of interim acrylic resins on the expression of cytokines from epithelial cells and on collagen degradation. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 110(4), 296-302.
- Burns, D. R., Beck, D. A., & Nelson, S. K. (2003). A review of selected dental literature on contemporary provisional fixed prosthodontic treatment: Report of the Committee on Research in Fixed Prosthodontics of the Academy of Fixed Prosthodontics. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 90(5), 474-497.
- Chaves, C. A., Machado, A. L., Vergani, C. E., Souza, R. F., & Giampaolo, E. T. (2012). Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: a systematic review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 107, 114-127.

- Chaves, C., Machado, A., Carlos, I., Giampaolo, E., Pavarina, A., & Vergani, C. (2010). Cytotoxicity of monomers, plastizer and degradation by-products released from dental hard chairside relined resins. *Dental Materials*, 26, 1017-1023.
- Chen, H.-L., Lai, Y.-L., Chou, I.-C., & Hu, C.-J. (2008). Shear bond strength of provisional restoration materials repaired with light-cured resins. *Operative Dentistry*, 33(5), 508-515. doi:10.2341/07-130
- Cleveland, C. M., Allen, A. D., & Henson, N. (2012). *Dentalcare.com*. Obtido em 17 de Maio de 2014, de Crest Oral-B ate dentalcare.com Continuing Education Course: www.Dentalcare.com
- García- López, D. A., Rezende, C. E., Hiramatsu, D. A., Nishida, C. L., & Rubo, J. H. (2013). Estabilidade dimensional de uma resina acrílica para coroas provisórias em função de diferentes técnicas de processamento ao longo do tempo. *Revista de odontologia da UNESP*, 42(3), 196-203.
- Gautam, R., Singh, R., Sharma, V., Siddhartha, R., Chand, P., & Kumar, R. (2012). Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *J Biomed Mater Res*, 5, 1444-1450.
- Gauthier, M. A., Simard, P., Zhang, Z., & Zhu, X. X. (2007). Bile acids as constituents for dental composites: in vitro cytotoxicity of (meth)acrylate and other ester derivatives of bile acids. *Journal of The Royal Society*, 4, 1145-1150. doi:10.1098/rsif.2007.1018
- Gegauff, A. G., & Holloway, J. A. (2006). Interim fixed restorations. In Rosentiel, Land, & Fujimoto, *Contemporary Fixed Prosthodontics* (fourth ed., pp. 466-504). Mosby ELSEVIER.
- Givens, E., Neiva, G., Yaman, P., & Dennison, J. (2008). Marginal adaptation and color stability of four provisional materials. *Journal of Prosthodontics*, 17, 97-101.
- Gociu, M., Patroi, D., Prejmerean, C., Pastrav, O., Boboia, S., Prodan, D., & Moldovan, M. (2013). Biology and cytotoxicity of dental materials: an in vitro study. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*, 54, 261-265.
- Goldberg, M. (2008). In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Invest*, 12, 1-8. doi:10.1007/s00784-007-0162-8
- Goldberg, P. V., Higginbottom, F. L., & Wilson, T. G. (2008). Periodontal considerations in restorative and implant therapy. *Periodontology 2000*, 25, 100-109.

- Gough, J., & Downes, S. (2001). Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis. *J Biomed Mater Res*, 57, 497-505.
- Gujjari, A. K., Bhatnagar, V. M., & Basavaraju, R. M. (2013). Color stability and flexural strength of poly (methyl methacrylate) and bis-acrylic composite based provisional crown and bridge auto-polymerizing resins exposed to beverages and food dye: An in vitro study. *Indian J Dent Res*, 24, 172-177.
- Haselton, D., Diaz-Arnold, A., & Dawson, D. (2005). Color stability of provisional crown and fixed partial denture resins. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 93, 70-75.
- Haselton, D., Diaz-Arnold, A., & Vargas, M. A. (2002). Flexural strength of provisional crown and fixed partial denture resins. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 87(2), 225-228.
- Higashi, C., Gomes, J. C., Kine, S., Andrade, O. S., & Hirata, R. (2009). *Planejamento estético em dentes anteriores*. Obtido em 20 de Maio de 2014, de [www.kinascopinhirata.com.br](http://www.kinascopinhirata.com.br)
- Inforlab. (2014). [www.inforlablaboratoriais.com.br](http://www.inforlablaboratoriais.com.br). Obtido em 1 de Setembro de 2014
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., & Ueno, K. (1996). A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Pharmaceutical Society of Japan*, 19(11), 1518-1520.
- ISO 10993-5:2009. (2009). Biological evaluation of medical devices.
- Ivkovic, N., Bozovic, D., Ristic, S., Mirjanic, V., & Jankovic, O. (2013). The residual monomer in dental acrylic resin and its adverse affects. *Contemporary Materials*, IV(1), 84-91. doi:10.7251/COMEN13010841
- Jorge, J. H., Giampaolo, E. T., & Pavarina, A. C. (2004). Citotoxicidade dos materiais dentários. Revisão de literatura. *Revista de odontologia da UNESP*, 33(2), 65-68.
- Kerby, R. E., Knobloch, L. A., Sharples, S., & Peregrina, A. (2013). Mechanical properties of urethane and bis-acryl interim resin materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 110(1), 21-28.
- Kerr. (2011). *Kavo Kerr Group*. Obtido em 5 de Janeiro de 2014, de <http://www.kerrdental.eu/>
- Kim, S. H., & Watts, D. C. (2004). Polymerization shrinkage-strain kinetics of temporary crown and bridge materials. *Dental Materials*, 20(1), 88-95.



- Knetsch, M. L. (2013). Evolution of current and future concept of biocompatibility testing. In S. Dumitriu, & V. Popa, *Polymeric Biomaterials - Structure and Function* (Third ed., Vol. 1, pp. 377-415). Taylor & Francis.
- Konstantinidis, I., Kotsakis, G., Pallis, K., & Walter, M. (2013). A novel technique for the direct fabrication of fixed interim restorations. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 109(3), 198-201.
- Kurtzman, G. K. (2008). *Dentalaegis*. Obtido em 2014, de Inside Dentistry: <http://www.dentalaegis.com/id/2008/09/crown-and-bridge-temporization-part-1-provisional-materials>
- Labban, N., Song, F., Al-Shibani, N., & Windsor, L. J. (2008). Effects of provisional acrylic resins on gingival fibroblast cytokine/growth factor expression. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 100, 390-397.
- Luthardt, R., Stöbel, M., Hinz, M., & Vollandt, R. (2000). Clinical performance and periodontal outcome of temporary crowns and fixed partial dentures: A randomized clinical trial. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 83, 32-29.
- Mathur, S., Shah, A., Makwana, R., Shah, M., Shah, A., & Jathal, N. (2013). Provisional restorative materials in fixed prosthodontics: A comprehensive review. *BUJOD*, 3(3), 49-57. Obtido de <http://www.bujod.in/sep2013/BUJOD%202013-sept-8.pdf>
- Meerloo, J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Culture: Methods in Molecular Biology*, 237-245.
- Michalakis, K., Pissiotis, A., Hirayama, H., Kang, K., & Kafantaris, N. (2006). Comparison of temperature increase in the pulp chamber during the polymerization of materials used for the direct fabrication of provisional restorations. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 96(6), 418-423.
- Moharamzadeh, K., Brook, I. M., & Noort, R. V. (2009). Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials*, 2, 514-548. doi:10.3390/ma2020514
- Moharamzadeh, K., Noort, R., Brook, I., & Scutt, A. (2007). Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dental Materials*, 23, 40-44.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological methods*, 65 (1-2), 55-63.

- Nascimento, A. P. (2013). Estudo comparativo da reação produzida em fibroblastos gengivais por três tipos de cimentos utilizados em prótese fixa (Tese de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.
- Nassiri, M. R., Hanks, C. T., Cameron, M. J., Strawn, S. E., & Craig, R. G. (1994). Application of flow cytometry to determine the cytotoxicity of urethane dimethacrylate in human cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 28, 153-158.
- Palacci, P., & Nowzari, H. (2008). Soft tissue enhancement around dental implants. *Periodontology 2000*, 47, 113-132.
- Papadopoulos, I., Pozidi, G., Goussias, H., & Kourtis, S. (2014). Transferring the emergence profile from the provisional to the final restoration. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 26(3), 154-161.
- Poonacha, V., Poonacha, S., Salagundi, B., P.L, R., & Raghavan, R. (2013). In vitro comparison of flexural strength and elastic modulus of three provisional crown materials used in fixed prosthodontics. *J Clin Exp Dent.*, 5, 212-217.
- Pourabbas, R., Farajnia, S., Kimyai, S., Mohammadnejad, L., Johnson, A., & Nejatian, T. (2009). In vitro assessment of cytotoxicity of giomer on human gingival fibroblasts. *African Journal of Biotechnology*, 8(20), 5522-5526.
- Rogero, S. O., Lugão, A. B., Ikeda, T. I., & Cruz, A. S. (2003). Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, 6(3), 317-320.
- Schedle, A., Franz, A., Rausch-Fan, X., Spittler, A., Lucas, T., Samorapoompichit, P., . . . Boltz-Nitulescu, G. (1998). Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dental Materials*, 14(6), 429-440.
- Schmalz, G., & Arenholt-Bindslev, D. (2009). Basic Aspects. In G. Schmalz, & D. Arenholt-Bindslev, *Biocompatibility of Dental Materials* (pp. 1-11). Berlin, Alemanha: Springer.
- Schmalz, G., & Arenholt-Bindslev, D. (2009). Basic Aspects. In G. Schmalz, & D. Arenholt-Bindslev, *Biocompatibility of Dental Materials* (pp. 1-11). Springer.
- Sen, D., Göller, G., & Issever, H. (2002). The effect of two polishing pastes on the surface roughness of bis-acryl composite and methacrylate-based resins. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 88(5), 527-532.
- Shillingburg, H. T., Sather, D. A., Wilson, E. L., Cain, J. R., Mitchell, D. L., Blanco, L. J., & Kessler, J. C. (2012b). Provisional Restorations. In H. T. Shillingburg,

- Fundamentals of fixed prosthodontics* (4<sup>a</sup> ed., pp. 241-268). Chicago, Berlin, Tokyo, London, Paris, Milan, Barcelona, Istanbul, Moscow, New Delhi, São Paulo, and Warsaw: Quintessence Publishing Co, Inc.
- Shillingburg, H. T., Sather, D. A., Wilson, E. L., Cain, J. R., Mitchell, D. L., Blando, J. L., & Kessler, J. C. (2012a). An Introduction to Fixed Prosthodontics. In H. T. Shillingburg, *Fundamentals of Fixed Prosthodontics* (Fourth ed., pp. 1-11). Quintessence Publishing Co, Inc.
- Shor, A., Shuler, R., & Goto, Y. (2008). Indirect Implant-Supported Fixed Provisional Restoration in the Esthetic Zone: Fabrication Technique and Treatment Workflow. *J Esthet Restor Dent*, 20, 82-97.
- Twentyman, P. R., & Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer*, 56, 279-285.
- Ulker, M., Ulker, H. E., Zortuk, M., Bulbul, M., Tuncdemir, A. R., & Bilgin, M. S. (2009). Effects of current provisional restoration materials on the viability of fibroblasts. *European Journal of Dentistry*, 3, 114-119.
- Vitral, J. C., Silva, A. A., Souza, M. A., Ferreira, A. P., & Vitral, R. W. (2008). Avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método de MTT e produção de óxido nítrico: descrição de uma técnica. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 8(3), 359-365.
- VOCO. (2012). *VOCO GmbH*. Obtido em 5 de Janeiro de 2014, de <http://www.voco.com/>
- Wang, X., Xia, Y., Liu, L., Liu, M., Gu, N., Guang, H., & Zhang, F. (2010). Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, 95B (2), 357-364. doi:10.1002/jbm.b.31723
- Watanabe, H., Kim, E., Piskorski, N., Sarsland, J., Covey, D., & Johnson, W. (2013). Mechanical properties and color stability of provisional restoration resins. *American Journal of Dentistry*, 26(5), 265-270.
- XENOMETRIX. (2014). *IN CYTOTOX - Testes para avaliação de citotoxicidade in vitro*. Obtido em 4 de Abril de 2014, de [www.graulab.com.br](http://www.graulab.com.br)
- Yoshii, E. (2007). Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res.*, 37(4), 517-524.

- Young, H. M., Smith, C. T., & Morton, D. (2001). Comparative in vitro evaluation of two provisional restorative materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 129-132.
- Zhang, J., Liao, J., Mo, A., Li, Y., Li, J., & Wang, X. (2008). Charecterization and human gingival fibroblasts biocompatibility of hydroxyapatite/PMMA nanocomposites for provisional dental implant restoration. *Applied Surface Science*, 255, 328-330.